

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Zuzana Flenerová

ANALÝZA PRODUKTŮ METATEZE KARDANOLŮ
POMOCÍ METODY HPLC-MS/MS

Analysis of products of cardanol metathesis by HPLC-MS/MS
method

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Miroslav Polášek, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. května 2015.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Miroslavu Poláškov, Ph.D. za jeho cenné rady a ochotu pomoci, za čas, který mi věnoval a trpělivost, kterou se mnou měl při psaní mé diplomové práce. Děkuji doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za ochotu být vždy k dispozici a Mgr. Jánů Žabkovi, CSc. Za technickou podporu při měření v laboratoři.

Dále děkuji RNDr. Vojtěchu Vargovi, CSc. a RNDr. Hynku Balcarovi, CSc. za pomoc při syntéze standardů, RNDr. Jánů Pásztorovi, CSc. za měření Ramanových a IR spekter, RNDr. Zdeněku Tošnerovi, PhD. za měření NMR spekter a doc. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za pomoc při měření produktů ion-molekulových reakcí s dimethylsulfidem. V neposlední řadě bych také ráda poděkoval rodině a přátelům, kteří mi byli během studia oporou.

Abstrakt:

Kardanolý jsou v dnešní době stále více používanými látkami v průmyslu polymerů, barviv, brzdných materiálů, ad. Tyto látky podobné lipidickým sloučeninám podléhají za správných podmínek metatezi. Hlavním cílem diplomové práce je analýza produktů metateze kardanolů metodou HPLC-MS/MS. Pro kvantitativní HPLC analýzu byl připraven standard 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenol, který je při metatezi kardanolů jedním z hlavních produktů. Tento standard byl připraven ve dvou krocích. Prvním krokem byla ethenolýza kardanolů za vzniku 3-(non-8-en-1-yl)fenolu. Druhým krokem přípravy byla homometateze 3-(non-8-en-1-yl)fenolu. Standard byl charakterizován pomocí metod HPLC/MS, EI-MS, ESI-MS/MS, UV/VIS, IR, Ramanovy a NMR spektroskopie. Druhá část práce je věnována studii mechanismu lokalizace dvojné vazby na dlouhých uhlovodíkových řetězcích metodou acetonitrilové APCI-MS. S pomocí jednoduchých modelových alkenů byla metodami MS a MS/MS zkoumána tvorba aduktů $[M + 55]^{+*}$, které v této metodě hrají klíčovou roli. Nakonec byla navržena struktura a mechanismus vzniku aduktů $[M + 55]^{+*}$ a způsob jejich fragmentace.

Klíčová slova:

Kardanol, metateze olefinů, HPLC-MS, lokalizace dvojných vazeb, APCI, acetonitril

Abstract:

Cardanols are more and more used in the industry of polymers, resins, coatings, friction materials, etc. At right conditions, these lipid-like chemicals can undergo metathesis reaction. The main aim of the diploma thesis is an analysis of products of cardanol metathesis by HPLC-MS/MS. Standard 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidiphenol, one of the main products of cardanol metathesis, was prepared for quantitative HPLC analysis. The standard was prepared in two steps. The first step was cardanol ethenolysis to give 3-(non-8-enyl)phenol. The second step was self-metathesis of 3-(non-8-enyl)phenol to give 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidiphenol. The standard was characterised by HPLC/MS, MS/MS, EI-MS, UV/VIS, IR, Raman and NMR spectroscopy. The second part of the thesis is dedicated to the study of a mechanism of double-bond localization method in long chain hydrocarbons by acetonitrile APCI-MS. The formation of adducts $[M + 55]^{+*}$, which are the key substances of this method, was studied using simple alkene models by MS and MS/MS. At the end, the structure and the mechanism of the formation of adducts $[M + 55]^{+*}$ were suggested.

Key words:

Cardanol, olefin metathesis, HPLC-MS, double-bond localization, APCI, acetonitrile

Obsah

Obsah	- 6 -
Seznam zkratk a symbolů	- 8 -
1 Úvod	- 10 -
2 Teoretická část	- 12 -
2.1 Kardanolý	- 12 -
2.2 Metateze	- 14 -
2.3 Katalyzátory metateze	- 17 -
2.4 Metoda HPLC	- 21 -
2.5 Lokalizace dvojných vazeb pomocí MS	- 24 -
3 Experimentální část	- 26 -
3.1 Seznam použitých chemikálií	- 26 -
3.2 Metody a instrumentace	- 27 -
3.2.1 Přístroj HPLC/MS	- 27 -
3.2.2 EI-MS	- 29 -
3.2.3 UV/VIS spektrofotometr	- 29 -
3.2.4 IR spektrometr	- 29 -
3.2.5 Ramanův spektrometr	- 29 -
3.2.6 NMR spektrometr	- 30 -
3.3 Syntéza bifenolického standardu	- 31 -
3.3.1 Katalyzátor	- 31 -
3.3.2 Metateze kardanolů - ethenolýza	- 31 -
3.3.3 Metateze 3-(non-8-en-1-yl)fenolu	- 32 -
3.3.4 Sběr frakcí pro měření Ramanových spekter	- 33 -
3.3.5 Měření Ramanových spekter	- 34 -
3.4 Studie mechanismu lokalizace dvojně vazby	- 35 -
4 Výsledky a diskuze	- 36 -
4.1 Analýza standardu	- 36 -
4.1.1 Optimalizace podmínek HPLC	- 36 -
4.1.2 HPLC/MS	- 36 -
4.1.3 MS/MS	- 41 -

4.1.4	EI-MS	- 43 -
4.1.5	UV/VIS spektra.....	- 44 -
4.1.6	IR a Ramanova spektra.....	- 46 -
4.1.7	NMR.....	- 48 -
4.2	Studie mechanismu lokalizace dvojné vazby	- 49 -
4.2.1	Ethylen.....	- 49 -
4.2.2	Propen.....	- 49 -
4.2.3	Hexeny.....	- 50 -
5	Závěr.....	- 54 -
	Reference	- 56 -

Seznam zkratk a symbolů

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (z angl. <i>Atmosphere Pressure Chemical Ionization</i>)
ATR	zeslabená úplná reflektance (z angl. <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
C18	oktadecyl
CI	chemická ionizace (z angl. <i>Chemical Ionization</i>)
CID	kolizně indukovaná disociace (z angl. <i>Collision-Induced Dissociation</i>)
CNSL	olej ze skořápek kešu oříšků (z angl. <i>Casew Nut Shell Liquid</i>)
Cp	cyklopentadienyl
Cy	cyklohexyl
DMDS	dimethyldisulfid
DQF-COSY	dvoukvantově filtrovaná korelační spektroskopie (z angl. <i>Double-quantum-filtered Correlation Spectroscopy</i>)
DTGS	deuterovaný triglycinsulfát (z angl. <i>Deuterated Triglycine Sulfate</i>)
EI	elektronová ionizace (z angl. <i>Electron Ionization</i>)
GC	plynová chromatografie (z angl. <i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (z angl. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
HMBC	heteronukleární vícevazebná korelační spektroskopie (z angl. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HSQC	heteronukleární jednokvantová korelační spektroskopie (z angl. <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>)
IR	infračervená oblast (z angl. <i>Infrared</i>)
M_r	relativní molekulová hmotnost, [g·mol ⁻¹]
MS	hmotnostně spektrometrická detekce (z angl. <i>Mass Spectrometry</i>)
m/z	poměr hmotnosti a nábojového čísla
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	normální fáze (z angl. <i>Normal Phase</i>)
OTs	toluensulfonát
Ph	fenyl
RCM	metateze s uzavíráním kruhu (z angl. <i>Ring Closing Metathesis</i>)

ROMP	metatetická polymerizace s otevíráním kruhu (z angl. <i>Ring opening metathesis polymerization</i>)
RP	obrácená fáze (z angl. <i>Reversed Phase</i>)
t	čas, [min]
UV	ultrafialová oblast (z angl. <i>Ultraviolet</i>)
VIS	viditelná oblast (z angl. <i>Visible</i>)
ZK	Zhanův katalyzátor
λ	vlnová délka, [nm]
σ	vlnočet, [cm ⁻¹]

1 Úvod

Kardanoly jsou v posledních letech stále více využívanými látkami pro polymerace, výrobu nátěrů, barviv, pryskyřic, konzervačních přísad, frikčních kapalin, voděodolného těsnění a dalších materiálů. Své využití nacházejí také v zemědělství [1] a v lékařství [2]. Výroba kardanolů spočívá ve vakuové destilaci oleje, který byl předtím extrahován ze skořápek ledvinovníku západního. Kardanoly tvoří směs fenolů substituovaných v poloze *meta* řetězcem obsahujícím 15 uhlíků a jednu, dvě nebo tři dvojné vazby. Nejenže jsou tyto látky levnými a dostupnými zdroji fenolů, ale přítomná dvojná vazba může podléhat metatetickým reakcím a tím napomáhat k rozšíření znalostí mechanismu metateze a účinnosti jejích katalyzátorů.

Metateze olefinů, jedna z moderních katalytických metod syntézy v organické chemii, se uplatňuje hlavně v petrochemii, v chemii detergentů a polymerů. Její využití je velmi slibné v chemii olejů. Metateze přírodních olejů a tuků podporuje používání obnovitelných zdrojů, což je jednou z hlavních zásad zelené chemie. Zrušením a znovu utvořením dvojné vazby vznikají z olefinů nové produkty. Klíčovým krokem tohoto procesu je reakce olefinu s přechodným metalokarbenovým komplexem [2+2] cykloadicí, čímž vzniká metalacyklobutenový intermediát [3]. Za objasnění mechanismu metateze a struktury intermediátu byla Chauvinovi, Schrockovi a Grubbsovi v roce 2005 udělena Nobelova cena.

Nejúčinnějšími katalyzátory metateze jsou rutheniové karbenové komplexy. V dnešní době je nejvíce dostupný a používaný Grubbsův katalyzátor druhé generace [4] a Hoveyda-Grubbsův katalyzátor první a druhé generace [5], ale nadále probíhají výzkumy modifikací těchto typů katalyzátorů [6], [7].

S mechanismem metateze souvisí i poloha dvojné vazby olefinu před reakcí a po ní. Jako spolehlivý způsob lokalizace dvojných vazeb nenasyčených lipidických látek se osvědčila metoda APCI-MS s použitím acetonitrilu [8]. Tato metoda je kompatibilní s HPLC a je založena na tvorbě a fragmentaci aduktů $[M + 55]^+$, kde M je molekula lipidické sloučeniny a kde hmotnostní inkrement 55 Da má elementární složení C_3H_5N . Struktura a mechanismus vzniku aduktů $[M + 55]^+$ nejsou dosud zcela objasněny.

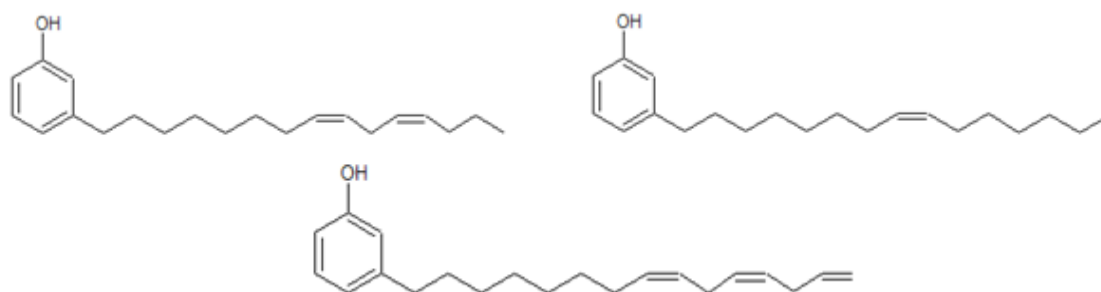
Tato práce je věnovaná analýze produktů metateze kardanolů metodou HPLC-MS/MS, což zahrnuje:

- optimalizaci podmínek měření;
- přípravu standardu 3-(non-8-en-1-yl)fenolu a standardu se dvěma fenolovými jádry 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu a jejich spektroskopickou charakterizaci;
- měření UV/VIS spekter standardů a určení absorpčních koeficientů;
- modelové hmotnostně spektrometrické studie zaměřené na objasnění mechanismu tvorby a fragmentace aduktů $[M + 55]^+$.

2 Teoretická část

2.1 Kardanolý

Kardanolý jsou přírodní fenolické lipidy (hustota $0,93 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) obsahující fenolické jádro a řetězec v *meta* poloze tvořený patnácti uhlíky s jednou, dvěma nebo třemi dvojnými vazbami. Konkrétně jsou kardanolý směsí tří látek s různým stupněm nasycení (viz Obrázek 1): 5-{8(Z),11(Z),14-pentadekatrienyl}fenolu, 5-{8(Z),11(Z)-pentadekadienyl}fenolu a 5-{8(Z)-pentadekaenyl}fenolu (převažují *cis* stereoizomery daných látek).



Obrázek 1 Struktura kardanolů

Zdrojem kardanolů je rostlina ledvinovníku západního (lat. *Anacardium occidentale*) z čeledi ledvinovnickovitých. Ledvinovník neboli kešu pochází původem z Jižní Ameriky, odkud se poté dostal do Asie a v dnešní době se již pěstuje ve všech tropických oblastech celého světa.[9]

Produkce kešu v poslední době stále stoupá s přibývajícím využitím jejich produktů.

Materiálem pro získávání kardanolů je konkrétně olej ze skořápek kešu oříšků (CNSL, z angl. *Cashew Nut Shell Liquid*), který je nejdůležitějším produktem procesu zpracování kešu díky svým jedinečným chemickým vlastnostem. Jedná se o tmavě hnědou viskózní kapalinu, která je žíravá při styku s kůží. Skořápky obsahují cca 25 – 30 % tohoto oleje, který je zdrojem nenasycených fenolů s dlouhým řetězcem. Obsahuje směs látek: kyselinu anakardovou, kardanol, kardol a 2-metylkardol.

Procentuální zastoupení složek CNSL závisí na metodě extrakce oleje ze skořápek kešu oříšků. Tak je rozlišován technický CNSL a přírodní CNSL. Technický CNSL (také známý jako dekarboxylovaný CNSL) je bohatší na množství kardanolu. Přírodní CNSL má naopak více kyseliny anakardové.

Extrakce CNSL z kešu může být prováděna třemi metodami [10]:

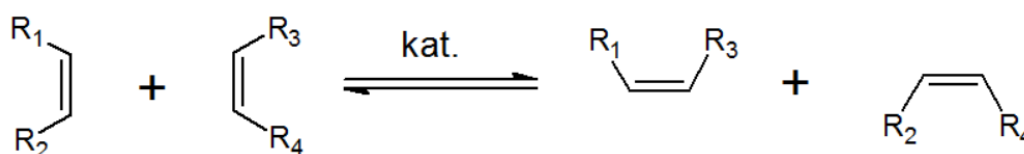
- termální extrakce;
- mechanická extrakce;
- extrakce rozpouštědlem (studená extrakce, horká extrakce za použití jiného rozpouštědla – Soxhletův extraktor, ultrazvuk nebo extrakce superkritickým oxidem uhličitým).

Olej může být také extrahován pomocí vakuové pyrolýzy.

Použití CNSL je zejména v průmyslu polymerů, je součástí nátěrů, barev, pryskyřic, frikčních materiálů či povrchově aktivních látek, konzervačních přísad, brzd a voděodolného těsnění. Polymery vyrobené z CNSL nabízí snazší zpracování a vysokou odolnost vůči působení kyselin a zásad. Jejich odolnost vůči hmyzu rozšiřuje jejich využití i do oblasti zemědělství [1] a antimikrobiální a protinádorové vlastnosti do oblasti lékařství [2].

2.2 Metateze

Metateze je chemická reakce, při níž dochází k výměně substituentů (nejčastěji na uhlíku) mezi dvěma reaktanty. Jedna z nejvýznamnějších reakcí je metateze olefinů, reakce řízená kovovým katalyzátorem na dvojnou vazbu, při které dochází k výměně substituentů daných uhlíků. Stará dvojná vazba se při reakci zruší a vytvoří se nová (viz Obrázek 2).



Obrázek 2 Schéma metateze olefinů

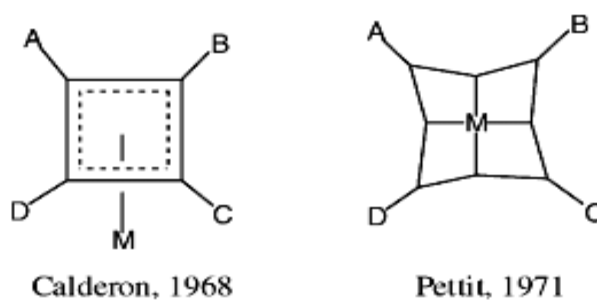
Reakce je termodynamicky řízený proces. V chemické syntéze se často používají alkeny (alkyny) s dvojnou (trojnou) vazbou na konci řetězce. Vznik etylenu (případně acetylenu) posouvá rovnováhu ve směru produktů. To platí také pro olefiny, jejichž metatezí vzniká 2-buten. Jeho těkavost posune rovnováhu reakce ve prospěch produktů. Rovnováhu reakce lze ovlivnit také prací za sníženého tlaku, který zajišťuje odstranění těkavého produktu. V praxi je většina metatetických reakcí ovlivňována kineticky.

Poprvé byla pozorována metateze propenu při vysoké teplotě už v roce 1931. První katalyzovaná metatetická reakce byla objevena v roce 1951, když průmysloví chemici Eleuterio, Peters, Evering, Banks and Bailey ve společnosti Standard Oil and Phillips Petroleum pozorovali, že při reakci propenu vznikl etylen a 2-buten. [11] Výchozí látka byla zahřívána v přítomnosti molybdenu ve formě oxidu (nebo ve formě kovu či komplexu $[W(CO)_6]$) aktivovaného hydridem hlinito-lithným na oxidu hlinitém ($MoO_3/Al_2O_3/LiAlH_4$). Analýza produktů infračervenou (IR, z angl. *Infrared*) spektroskopií potvrdila předpokládanou disproportionaci.

První polymeraci bicyklo[2.2.1]hept-2-enu provedli nezávisle na sobě Eleuterio [12; 13] a Truett [14] v roce 1960. Teprve v roce 1967 bylo zjištěno, že reakce metateze s otevřením kruhu je stejná reakce jako metateze necyklických olefinů.

Na konci 60. let 20. století byl mechanismus metateze olefinů záhadou. Název metateze poprvé použil Calderon v roce 1967 [15]. Calderon navrhl mechanismus zahrnující meziprodukt vznikající π -interakcí cyklobutanu s kovem [15]. Při metatezi ale nevzniká cyklobutan a katalyzátor nereaguje s cyklobutanovými deriváty za vzniku olefinů.

V roce 1971 Pettit navrhl meziprodukt reakce tetrametylen s sp^3 hybridizovanými atomy uhlíku navázanými na kovový komplex přes dvojnou vazbu sdílenou třemi atomy – dvěma uhlíky a kovem (viz Obrázek 3). [16] Později byl tento mechanismus vyloučen. Pettitovi konkuroval ve stejném roce Chauvin a jeho student Hérison, kteří popsali mechanismus metateze přes jiný meziprodukt. Inspirovali se prací Fischera na syntézu wolfram-karbenového komplexu [17], Nattovou prací na polymeraci cyklopentenu za použití WCl_6 a $AlEt_3$ [18] a prací Bankse a Baileyho na výrobu etylenu a 2-buteny za použití komplexu $[W(CO)_6]$ na oxidu hlinitém [19].

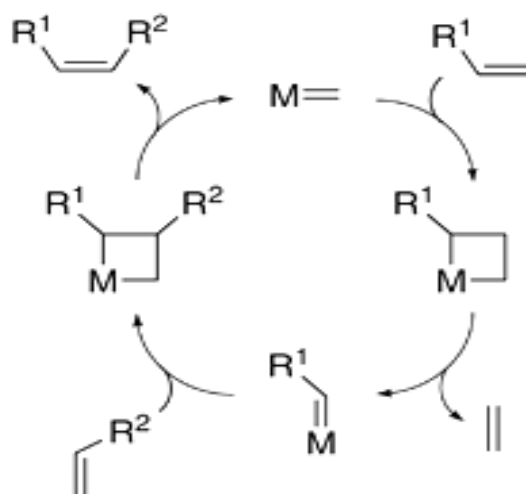


Obrázek 3 Navrhnutých struktur meziproduktů metatetické reakce [20]

Chauvin a jeho skupina experimentálně potvrdili navržený mechanismus metateze při pokusech s metalokarbenovým komplexem, který sloužil jako katalyzátor a iniciátor reakce [3]. Na vývoji katalyzátorů se významně podíleli také Schrock a Grubbs, kteří podložili mechanismus metateze olefinů a mechanismus tak byl obecně přijat. Roku 2005 dostali Chauvin, Schrock a Grubbs Nobelovu cenu za vysvětlení a rozvoj metateze olefinů.

Metateze olefinů je katalyzována přes přechodný metalokarbenový komplex. [3] Nejprve se olefin $[2+2]$ cykloadicí naváže na metalokarben za vzniku metalacyklobutanového přechodového stavu (intermediátu), který se dále rozpadá na molekulu jiného olefinu a nový metalokarben. Metalokarben pak znovu reaguje stejným

způsobem s druhým olefinem. Dojde tak ke vzniku produktu a k regeneraci katalyzátoru (viz Obrázek 4).



Obrázek 4 Schéma mechanismu metateze olefinů a tvorby metalokarbenu [21]

Metateze se rozlišuje dle reagujících výchozích látek, průběhu reakce a vznikajících vazeb.

Typy metateze lze rozdělit do následujících kategorií [20]:

- metateze alifatických alkenů: kometateze (*Cross-metathesis*), homometateze (*Self metathesis*) je kometatezí dvou identických olefinů;
- metateze s otevíráním kruhu (*Ring opening metathesis*);
- acyklická metateze dienů (*Acyclic diene metathesis polymerization*);
- metatetická polymerizace s otevíráním kruhu (ROMP, z angl. *Ring Opening Metathesis Polymerization*);
- metateze s uzavíráním kruhu (RCM, z angl. *Ring Closing Metathesis*);
- metateze enynů (*Enyne metathesis*);
- kometateze s otevíráním kruhu (*Ring opening cross-metathesis*).

2.3 Katalyzátory metateze

Prvními známými metalokarbenovými katalyzátory byly v 60. letech 20. století katalyzátory Fischerova typu. Byly to přechodné metalokarbenové komplexy stabilizované heteroatomem navázaným na karbenovém uhlíku [17]. Některé katalyzátory Fischerova typu mohou podporovat metatezi olefinů. První výsledky s těmito komplexy publikovali Casey a Burkhardt, kteří popsali reakci komplexu $[W(CO)_5(=CPh_2)]$ s isobutanem za vzniku 1,10-difenyletylenu [22].

První katalytické systémy byly na bázi molybdenu a wolframu. Byly to buď oxidy (např. WO_3/SiO_2), které se používaly v průmyslu pro přeměnu propylenu na etylen a buteny, nebo Ziegler-Nattův systém a jeho deriváty jako např. WCl_6 (nebo $MoCl_5$) + AlX_nR_{3-n} nebo (SnR_4) . Chauvin pro své experimenty použil katalytické systémy $WOCl_4/Al(C_2H_5)Cl_2$ a $WOCl_4/Sn(C_4H_9)_4$. Katalyzátor obsahující cín byl připraven přeměnou Ziegler-Nattova katalyzátoru (1963 – Nobelova cena za chemii) založený na chloridu titaničitým $TiCl_4$ s dietylchloridem/triethylalumiinem. [23]

Nevýhodou prvotních metalokarbenových katalyzátorů byla jejich nízká stabilita, jejíž důvod se přičítal slabé vazbě kovu a uhlíku. S objasněním této nestability přišel Wilkinson, který syntetizoval stabilní dvojité metaloalkylové komplexy neobsahující β -vodík. Bylo zjištěno, že nestabilita byla způsobena kineticky, β -eliminací [24]. Tyto komplexy byly sice stabilní, avšak nekatalyzovaly metatezi olefinů.

Jako velmi efektivní se ukázaly být molybdenové a wolframové katalyzátory, které ukázaly nejvyšší aktivitu v metatezi alkenů a jsou v dnešní době snadno komerčně dostupné. Schrock a jeho kolegové proto vynaložili velké úsilí pro objevení stabilních metalokarbenů těchto dvou kovů, které by efektivně katalyzovaly metatezi nenasycených uhlovodíků. Výzkum byl nakonec úspěšný [25] a přinesl velkou škálu molybden- a wolfram-karbenových komplexů s obecným vzorcem $[M(=CHCMe_2Ph)(=N-Ar)(OR_2)]$, kde R je objemná skupina.

K vývoji katalyzátorů dále přispěli Osborn [26-29] a Basset [30; 31] se svými wolframovými komplexy, aktivními při metatezi olefinů. Osborn prováděl polymerace s již dříve Shrockem dobře určeným wolframovým katalyzátorem [32] a dále ukázal pomocí 1H nukleární magnetické rezonance (NMR) spektroskopie charakter polymerizačního systému a meziprojektu wolframcyklobutanu. Basset popsal

aryloxoalkoxoalkyliden-wolframový katalyzátor, který byl jedním z prvních příkladů iniciátorů reakce neobsahujících Lewisovy kyseliny a umožňujících polymeraci substituovaných bicycklických sloučenin ROMP mechanismem.

Výhodou Schrockových katalyzátorů objevených v 90. letech 20. století je jejich vysoká aktivita, molekularita (není potřeba přidat aditiva) a také komerční dostupnost. Například molybdenové komplexy nereagují s olefiny, ale selektivně a efektivně zaměňují substituenty alkynů bez potřeby použití ko-katalyzátoru. Některé reakce probíhají dokonce i při 25 °C. Zde jsou pro metatezi rozhodující alkoxid ligandy.

Tebbovo činidlo je také efektivní pro dosažení příslušné karbonyl-olefinové reakce, což dokazuje Grubbsova studie komplexu $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CH}_2)(\text{ClAlMe}_2)]$ [33], který reaguje s olefiny v přítomnosti dimethylaminopyridinu za vzniku titanocyklobutanů, které pomalu katalyzují metatezi a které mohou být použity k určení všech meziproduktů metateze olefinů.

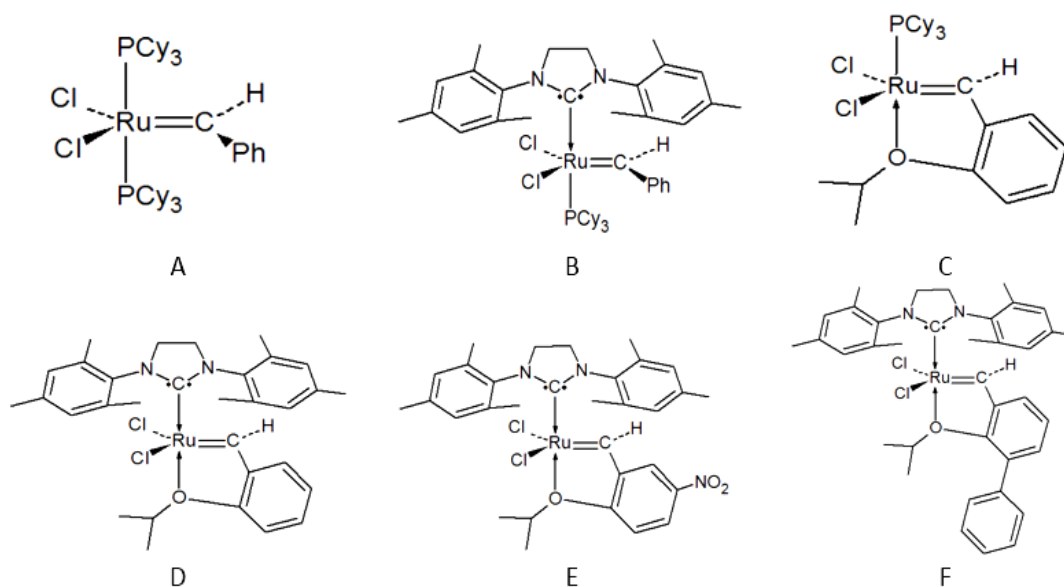
Obvykle jsou rozlišovány dva typy metalokarbenových katalyzátorů: ty jenž obsahují nukleofilní karben Schrockova typu a ty jenž obsahují elektrofilní karben Pettitova typu. Pettit se zajímal o metylenkarbenové komplexy, z nichž se snažil odvodit metylenové meziprodukty ve Fischer–Tropschově procesu. Roku 1966 tak přišel s charakteristikou reaktivity nového druhu katalyzátorů $[\text{FeCp}(\text{CO})_2(=\text{CH}_2)]^+$. [34] Později došlo k záměně Cp ($\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$) za Cp* ($\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5$), čímž mohla být rotační bariéra vazby $\text{Fe}=\text{CH}_2$ popsána metodou NMR. [35] Green v roce 1971 [36] syntetizoval první rutheniový komplex Fischerova typu $[\text{RuCp}\{=(\text{Me})\text{OMe}\}(\text{CO})(\text{PCy}_3)][\text{PF}_6]$ stabilizovaný metoxy skupinou na karbenovém uhlíku.

Grubbs, inspirován Nattovou prací z roku 1965 ohledně RuCl_3 katalyzujícího polymeraci cyklobutenu a 3-metylcyklobutenu probíhající mechanismem otevíráním kruhu [37], provedl polymeraci 7-oxabicyklo[2.2.1]hept-2-enu za vzniku vysokomolekulárního monodisperzního polymeru ($M_r = 1,3 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) pomocí komplexu RuCl_3 nebo $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{OTs})_2$ (OTs = toluensulfonát). Tato katalýza byla ještě pozoruhodnější, když byla provedena ve vodě. [38] Krátce na to mohl Grubbs pozorovat za stejných podmínek reakce vznik ruthenium-karbenového meziproduktu a poté polymerizaci cyklooktanu, když byl do vodného roztoku $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{OTs})_2$ přidán ethyldiazoacetát. [38-43]

V roce 1992 Grubbs popsal první efektivní stabilní komplexy ruthenia podporující ROMP reakce nižších olefinů a katalýzu RCM dienů. Komplex má obecný vzorec $[\text{RuCl}_2(\text{PR}_3)(=\text{CH}-\text{CH}=\text{CPh}_2)]$ ($\text{R} = \text{Ph}$ nebo Cy). $[\text{Ru}(=\text{CHPh})\text{Cl}_2(\text{PCy}_3)_2]$ je známý jako Grubbsův katalyzátor první generace a je organickými chemiky nejpoužívanějším katalyzátorem metateze díky své stabilitě na vzduchu a snášenlivosti s různými funkčními skupinami (kromě aminů a nitrilů). [42]

Grubbsův katalyzátor druhé generace $[\text{RuCl}_2\{\text{C}(\text{N}(\text{mesityl})\text{CH}_2)_2\}(\text{PCy}_3)(=\text{CHPh})]$ byl navrhnut o pár let později Nolanem [4], Grubbssem [44-49], Fürstnerem a Hermannem [50]. V dnešní době je to nejvíce používaný katalyzátor kometateze, přestože je neslučitelný s aminy a nitrily (pro představu Schrockův katalyzátor je účinný i v přítomnosti acetonitrilu).

Hoveyda [5], Hofmann [51], Grela [52] a Blechert [7] popsali jiný velmi aktivní stabilní rutheniový katalyzátor metateze. První katalyzátor Hoveyдова typu je odvozený od Grubbsova katalyzátoru první generace a nese pouze jeden fosfin a chelatuující karbenový ligand. Druhý typ Hoveyдова katalyzátoru nese Arduengův karben místo fosfinu. Oba katalyzátory jsou komerčně dostupné, avšak poměrně drahé. Grela se zabýval různými variantami Hoveyдова katalyzátoru se zvýšenou účinností (aktivní i při 0 °C). Grelův nápad byl destabilizovat Ru-O etherovou vazbu, aby se podpořila dekoordinace etheru, čímž se vytvoří katalyticky aktivní čtrnáctielektronový systém. [6] V porovnání s Grubbsovým katalyzátorem druhé generace je skupina Hoveyदových katalyzátorů vhodná k obtížnějším metatezím polysubstituovaných olefinů a selektivní kometatezi, při které je potřeba se vyvarovat samopárování. [5] Nejúspěšnější variantu Ru-benzylidenového katalyzátoru popsal Blechert [7]. Účinnost a stabilita Blechertových komplexů předčila všechny ostatní rutheniové katalyzátory (viz Obrázek 5).



Obrázek 5 Katalyzátory Grubbsova typu [20]: A – Grubbsův katalyzátor 1. generace (1995); B – Grubbsův katalyzátor 2. generace (1999); C – Hoveydtův katalyzátor prvního typu (1999); D – Hoveydtův katalyzátor druhého typu (1999); E – Grelův katalyzátor (2000); F – Blechertův katalyzátor (2002)

Díky objevu matalokarbenového katalyzátoru metateze olefinů pronikla do různých oborů např. zelené chemie, syntézy přírodních látek či chemie polymerů [53].

2.4 Metoda HPLC

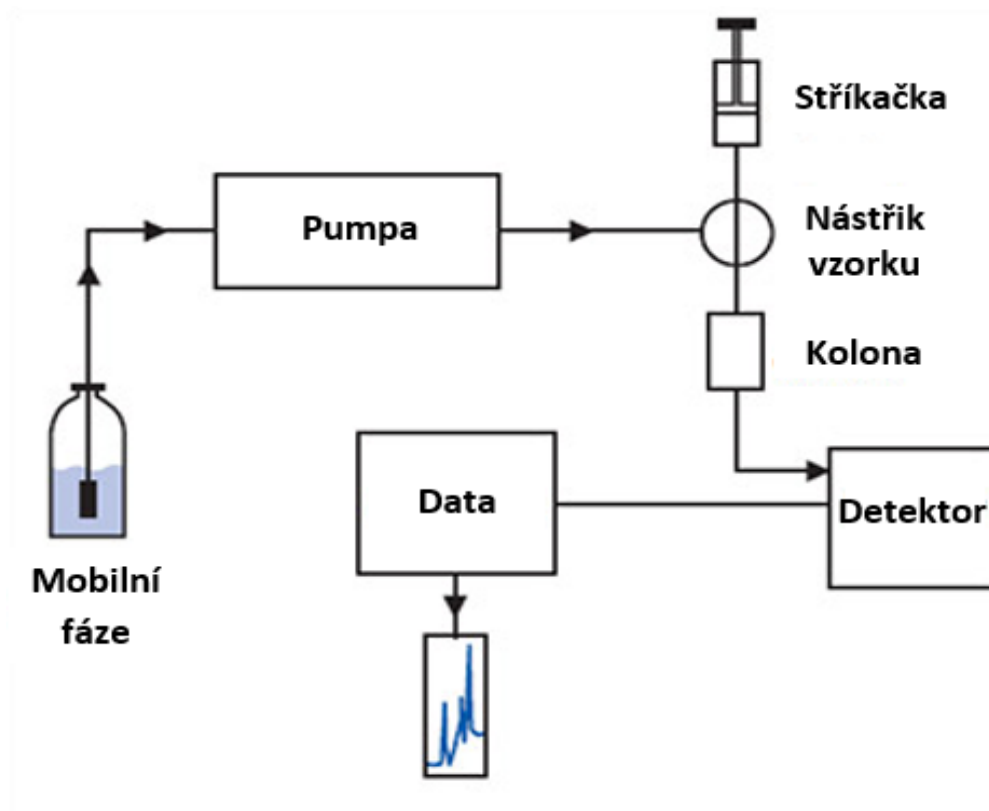
Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. *High Pressure Liquid Chromatography*) je jeden z typů kolonové chromatografie nejčastěji používaná v biochemii a analytické chemii pro separaci, identifikaci a stanoven množství aktivní sloučeniny. [54] V této metodě je používána kolona se stacionární fází, pumpa pohánějící mobilní fází kolonou a detektor ukazující retenční časy molekul. Retenční časy závisí na interakci mezi stacionární fází, analyzovanou molekulou a použitým rozpouštědlem. [55] Analyzovaný vzorek je v malém objemu nadávkován do proudu mobilní fáze a poté je na koloně zadržen určitými chemickými nebo fyzikálními interakcemi se stacionární fází. Tyto interakce závisí na vlastnostech analytu a složení stacionární a mobilní fáze. Čas, ve kterém určitý analyt eluuje (vychází druhým koncem kolony), se nazývá retenční čas.

Běžně užívaná rozpouštědla zahrnují různé mísitelné kombinace vody nebo organických rozpouštědel (nejčastěji methanol a acetonitril). [55; 56] Pokud se mění složení mobilní fáze při analýze, je tento děj nazýván gradientovou elucí. [56] Gradientová eluce funguje na principu afinity analytu pro danou mobilní fází (v určitém čase), která je rozdílná od afinit dalších složek směsi. Výběr rozpouštědel, přísad a gradientu závisí na vlastnosti stacionární fáze a analytu.

HPLC je rozdělována dle typu použité stacionární a mobilní fáze.

- Chromatografie s normální fází (NP, z angl. *Normal Phase*): separuje analyty na základě polarity. NP-HPLC používá polární stacionární a nepolární mobilní fází. Polární analyt interaguje se stacionární fází, na které je zadržován. Adsorpce na koloně roste s polaritou analytu, což zvyšuje retenční čas.
- Chromatografie s obrácenou fází (RP, z angl. *Reversed Phase*): používá nepolární stacionární a mírně polární vodnou mobilní fází. Metoda funguje na základě hydrofobních interakcí, které vyplývají z odpuzivých sil mezi polární mobilní fází, relativně nepolárním analytem a nepolární stacionární fází. Vazba analytu na stacionární fází je úměrná ploše povrchu nepolární části molekuly analytu po spojení s ligandem z vodné mobilní fáze.

Každý přístroj HPLC má zásobník mobilní fáze, pumpu (nebo sérii pump), systém na dávkování vzorku, kolonu, detektor a počítač zobrazující naměřená data (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).



Obrázek 6 Schéma HPLC přístroje

Vzorek je nejprve nastříknut do dávkovací smyčky. Dávkovací smyčky jsou většinou šesticestné ventily s definovaným nebo volitelným objemem (dávkování je reprodukovatelné). Za atmosférického tlaku je vzorek nasáván do proudu mobilní fáze, která proudí z pumpy do kolony. Za vyššího tlaku je vzorek do mobilní fáze nastříknut, protože ta prochází dávkovací smyčkou a vnáší vzorek do kolony. Mobilní fáze je hnána pumpou. Nejčastěji používané pumpy jsou izokratické pro izokratickou eluci a binární nebo kvartérní po gradientovou eluci. Jde o dvojice sériově zapojených pístů s plynule proměnným zdvihem zajišťující stálý průtok, minimální tlakové pulzy, přesnou tvorbu gradientu a reprodukovatelnost.

Pro správnou analýzu na HPLC přístroji se musí zohlednit důležité parametry: vnitřní průměr a délka kolony, velikost částic a velikost pórů stacionární fáze a tlak.

Vnitřní průměr je kritický parametr, který stanovuje, kolik analytu projde kolonou. Tento parametr také ovlivňuje citlivost metody. Širší kolony jsou obvykle využívány v průmyslových procesech (např. purifikace léčiva pro pozdější použití). Kolony s malým vnitřním průměrem mají lepší citlivost a nižší spotřebu rozpouštědla na úkor kapacity. Dlouhé kolony zajišťují lepší rozlišení a vyšší účinnost separace - počet pater, dobu analýzy a pracovní tlak. Zvětšuje se také spotřeba mobilní fáze. S kratší kolonou se snižuje doba analýzy.

Většinou je v HPLC používána stacionární fáze navázaná na malé kulovité částice oxidu křemičitého. Menší částice poskytují větší povrch a tím lepší separaci, ale tlak potřebný k nejvýhodnější lineární rychlosti stoupá s obrácenou hodnotou vnitřního průměru umocněného na druhou.

S povrchem stacionární fáze souvisí velikost pórů. Malé póry poskytují větší povrch, přičemž větší póry poskytují lepší pohyblivost hlavně větších analytů. Velikost pórů vymezuje schopnost analytu vniknout do částice stacionární fáze a interagovat s jejím povrchem. Poměr vnějšího povrchu k vnitřnímu povrchu částice je 1 : 1000, povrchově molekulární interakce probíhají převážně na vnitřním povrchu částice.

Moderní HPLC systémy pracují za vysokých tlaků (5 - 60 MPa), a proto je možné použít mnohem menší velikosti částic v kolonách (menší než 2 μm).

Analyty separované na koloně prochází detektorem, jehož odezva (signál) se přenáší do počítače. Detekce je zpravidla spektrofotometrická v ultrafialové (UV, z angl. *Ultraviolet*) nebo viditelné (VIS, z angl. *Visible*) oblasti, refraktometrická, fluorescenční, ampérometrická nebo hmotnostně spektrometrická. Požadavky na detektor jsou vysoká citlivost a zároveň nízká citlivost ke změnám průtoků a tlaku, široký koncentrační rozsah lineárního úseku odezvy a dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou.

Výstupem měření metodou HPLC je chromatogram. Na ose y je měřený signál a na ose x je retenční čas.

2.5 Lokalizace dvojných vazeb pomocí MS

Lokalizace dvojných vazeb nenasycených sloučenin s dlouhým řetězcem je klasický analytický problém, obzvláště v případech kdy jsou analyty přítomny ve směsích nebo v nízkých koncentracích.

Dobrým příkladem vyšších nenasycených organických látek jsou lipidy. Nejrozšířenější metodou analýzy lipidů je metoda plynové chromatografie (GC, z angl. *Gas Chromatography*) s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS, a angl. *Mass Spectrometry*). Úspěšná je také analýza některých lipidů pomocí metody HPLC/MS [57; 58]. Dosud bylo na téma analýzy esterů vyšších mastných kyselin a vyšších jednosytných alkoholů (vosků) pomocí metody HPLC/MS publikovaných prací jen málo [59-62]. Díky svému nepolárnímu charakteru byly vosky separovány v systému nevodného prostředí na reverzní fázi s modifikovanou kolonou C18. Separace byla provedena při izokratické eluci s mobilní fází acetonitril/acetone [60-62] nebo methanol/acetone/hexan [59].

Moneti a jeho spolupracovníci aplikovali chemickou ionizaci (CI, z angl. *Chemical Ionization*) s použitím acetonitrilu jako reagentu v plynné fázi pro zjištění molární hmotnosti uhlovodíků. Moneti využil tvorbu aduktů uhlovodíků s iontem CH_2CN^+ . [63] Moneti následně ukázal, že nenasycené uhlovodíky s jednou dvojnou vazbou tvoří adukty $[\text{M} + 54]^+$, a ty vytváří fragmenty prozrazující polohu dvojně vazby. [64] Adukt byl identifikován jako $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_4\text{N}]^+$, který vzniká přidavkem (1-metylenimino)-1-ethenyly ($\text{H}_2\text{C}=\text{N}^+=\text{C}=\text{CH}_2$) k dvojně vazbě na daném uhlovodíku. [65-69]

Využití hmotnostní spektrometrie a kolizně indukovaných disociací (CID, z angl. *Collision-Induced Dissociation*) ke zjištění struktury demonstrovali také Tada [62] a Butovich [70; 71]. Analýzu vosků pomocí metody HPLC/MS s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI, z angl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) s mobilní fází acetonitril/etylacetát provedl Cvačka a kolektiv [8]. Cvačka si všiml, že v přítomnosti acetonitrilu vosky vytváří adukt s obecným vzorcem $[\text{M} + 55]^{+\bullet}$ a dále se věnoval měření CID spekter a zkoumání fragmentů tohoto aduktu s vosky. Touto metodou bylo stanoveno více jak 50 druhů vosků ve složitějších směsích. [72] Adukt $[\text{M} + 55]^{+\bullet}$ nebyl nikdy předtím popsán, adukty triacylglycerolů $[\text{M} + 40]^+$, $[\text{M} + 54]^+$, $[\text{M} + 81]^+$ a $[\text{M} + 95]^+$ byly popsány v roce 2007 [73].

Z rozdílu naměřených přesných hmotností aduktu $[M + 55]^{+}$ a daného lipidu (M) bylo zjištěno, že těchto 55 Da má elementární složení C_3H_5N . Struktura a mechanismus vzniku aduktů $[M + 55]^{+}$ nejsou dosud zcela objasněny. Cvačka úspěšně aplikoval metodu lokalizace dvojných vazeb pomocí HPLC/APCI-MS i na metylestery mastných kyselin [74].

Metoda HPLC/APCI-MS je citlivostí srovnatelná s metodou GC/EI-MS (EI = elektronová ionizace, z angl. *Electron Ionization*) a projevila se jako účinná metoda k detekci a určení polohy dvojných vazeb na lipidických látkách a je slibnou metodou pro určení struktury dalších nenasycených látek s dlouhým řetězcem.

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

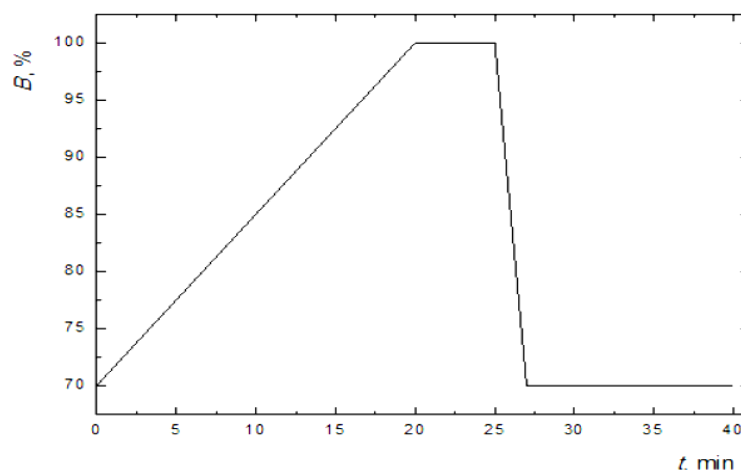
Tabulka 1 Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Standard kardanolů	99 %	Shanghai Boyle Chemicals Co. Ltd.
Zhanův katalyzátor dichloro[1,3-bis(2,4,6-trimetylfenyl)-2-imidazolinylden] [[5-[(dimethylamino)sulfonyl]-2-(1-metyletoxy-O)fenyl]metylen-C] ruthenium (viz 3.3.1)	≥ 96 %	Zhanan Pharmaceuticals
Toluen	p.a.	Lach-Ner
Ethylen	99,96 %	SIAD
Dichlormethan	p.a.	Lach-Ner
Silikagel (0,2 – 0,5 mm)	neudána	Merck
Diethylether	p.a.	Lach-Ner
1-hexen	97 %	Aldrich Chemistry
<i>cis</i> -2-hexen	95 %	Aldrich Chemistry
<i>trans</i> -2-hexen	97 %	Aldrich Chemistry
<i>trans</i> -3-hexen	≥ 99,9 %	Aldrich Chemistry
Propen	99%	Matheson
Izobuten	99,3%	Matheson
Methanol	≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich
Acetonitril	≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich
Kyselina mravenčí	49 – 51 %	Sigma-Aldrich

3.2 Metody a instrumentace

3.2.1 Přístroj HPLC/MS

Měření probíhalo na přístroji od firmy Waters tvořeném binární HPLC pumpou Waters 1525 μ , tandemovým kvadrupolovým hmotnostním spektrometrem Quattro Premiere XE a duálním UV absorpčním detektorem Waters 2487. Byla použita chromatografická kolona C18 (Hypersil BDS) s rozměry 150 \times 3 mm a velikostí částic 3 μ m. Pro separaci byla použita gradientová eluce (viz Obrázek 7) s mobilními fázemi: (A) voda s přidavkem 0,05% kyseliny mravenčí; (B) acetonitril s přidavkem 0,05% kyseliny mravenčí. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml·min⁻¹. Nástřik na kolonu byl prováděn manuálně pomocí dávkovacího ventilu (Rheodyne) s dávkovací smyčkou o objemu 5 μ l.



Obrázek 7 Graf průběhu gradientové eluce pro mobilní fázi B

Duální UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 280 nm.

Hmotnostní spektrometr byl nastaven do negativního módu (analýza negativních iontů), látky separované na koloně byly ionizovány pomocí elektrospreje a spektra byla zaznamenávána v rozsahu m/z 200 – 500 resp. 200 – 800. Doba skenu byla 2 s. Parametry elektrosprejového iontového zdroje byly následující: napětí na sprejovací kapiláře 2,8 kV, potenciál kuželové elektrody 30 V, teplota zdroje 100 °C, teplota nebulizačního plynu (N₂) 200 °C a průtok nebulizačního plynu 300 l·h⁻¹. Vzhledem

k vlastnostem měřených fenolických látek byly detekovány ionty $(M-H)^-$, které jsou viditelné právě v negativním módu.

Pro experimenty s modelovými olefiny a zkoumání jejich reakcí s ionty m/z 54, 55 nebo 56 byl použit APCI iontový zdroj, hmotnostní spektrometr byl nastaven do pozitivního módu (analýza pozitivních iontů) a spektra byla měřena v rozsahu m/z 20 – 400. Prvním kvadrupolem byl vždy vybrán daný iont, se kterým reagoval v T-WAVE srážkové cele neutrální plyn (tlak 500 Pa). Měření probíhalo za následujících podmínek: proud koronového výboje 20,5 μA , potenciál kuželové elektrody 24 V, teplota zdroje 100 °C, teplota nebulizačního plynu (N_2) 200 °C a průtok nebulizačního plynu 100 $l \cdot h^{-1}$. Detekovány byly adukty modelových olefinů s danými ionty $[M + 54]^+$, $[M + 55]^{+*}$ a $[M + 56]^+$.

3.2.2 EI-MS

Měření EI-MS spektra bylo prováděno na hmotnostním spektrometru sektorového typu ZAB2-SEQ. Vzorek by napouštěn do ionizační komory pomocí sondy přímého vstupu a plynné molekuly vzorku byly ionizovány svazkem elektronů o energii 70 eV při teplotě 150 °C. Přístroj byl nastaven do pozitivního módu. Magnetickým hmotnostním analyzátozem bylo proměřeno celé spektrum vzniklých kladných iontů.

3.2.3 UV/VIS spektrofotometr

Přístroj UV-1800 Shimadzu UV Spectrophotometer s dvoupaprskovým systémem byl použit k měření UV/VIS spekter. Spektra byla měřena v rozmezí 190 – 800 nm, resp. 190 – 400 nm. Skenovací interval byl nastaven na 0,2 nm. Zdroj záření se automaticky měnil při 340 nm. K měření byla používána křemenná kyveta o šířce 0,5 cm.

3.2.4 IR spektrometr

Pro měření IR spekter byl použit přístroj Nicolet 6700 s pyroelektrickým detektorem na bázi deuterovaného triglycinsulfátu (DTGS, z angl. *Deuterated Triglycine Sulfate*) a s děličem paprsků bromidem draselným. Byla použita technika zeslabené úplné reflektance (ATR, z angl. *Attenuated Total Reflectance*) s krystalem selenidu zinečnatého. Počet skenů byl nastaven na 64, rozlišení na hodnotu 4.

3.2.5 Ramanův spektrometr

Pro určení *cis* a *trans* izomerů bifenolického standardu byl použit přístroj DXR Raman Microscope Thermo Scientific, Madison, WI s 532nm laserem. Měřeny byly pouze Stokesovy linie. Spektrum bylo měřeno v rozsahu 46 – 3500 cm⁻¹ s časem expozice 5 s a s počtem expozic 100.

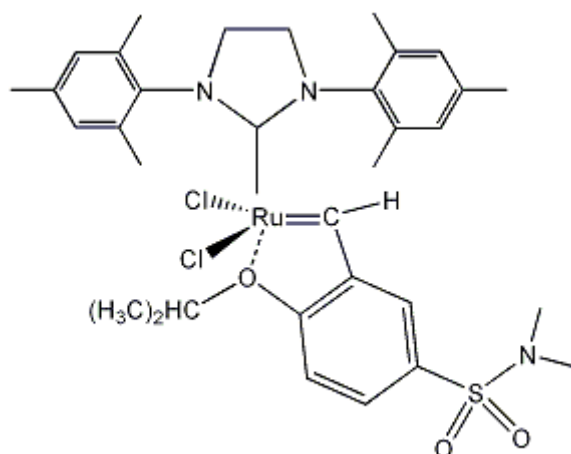
3.2.6 NMR spektrometr

Spektra NMR byla měřena na přístroji Bruker Avance III s vodíkovou frekvencí 600 MHz vybaveném chlazenou sondou s vysokou citlivostí. Experimenty zahrnovaly standardní vodíková a uhlíková spektra, spektrum DQF-COSY (z angl. *Double-quantum-filtered Correlation Spectroscopy*) ukazující J-interakce vodík-vodík, spektrum HSQC (z angl. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) pro korelace vodíků s uhlíky vázaných přes jednu chemickou vazbu a spektrum HMBC (z angl. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) pro korelace přes více vazeb.

3.3 Syntéza bifenolického standardu

3.3.1 Katalyzátor

Pro syntézu standardů 3-(non-8-en-1-yl)fenolu a 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylbifenolu byl použit Zhanův katalyzátor (ZK) (viz Obrázek 8) odvozený z Hoveyda – Grubbsova katalyzátoru druhé generace.

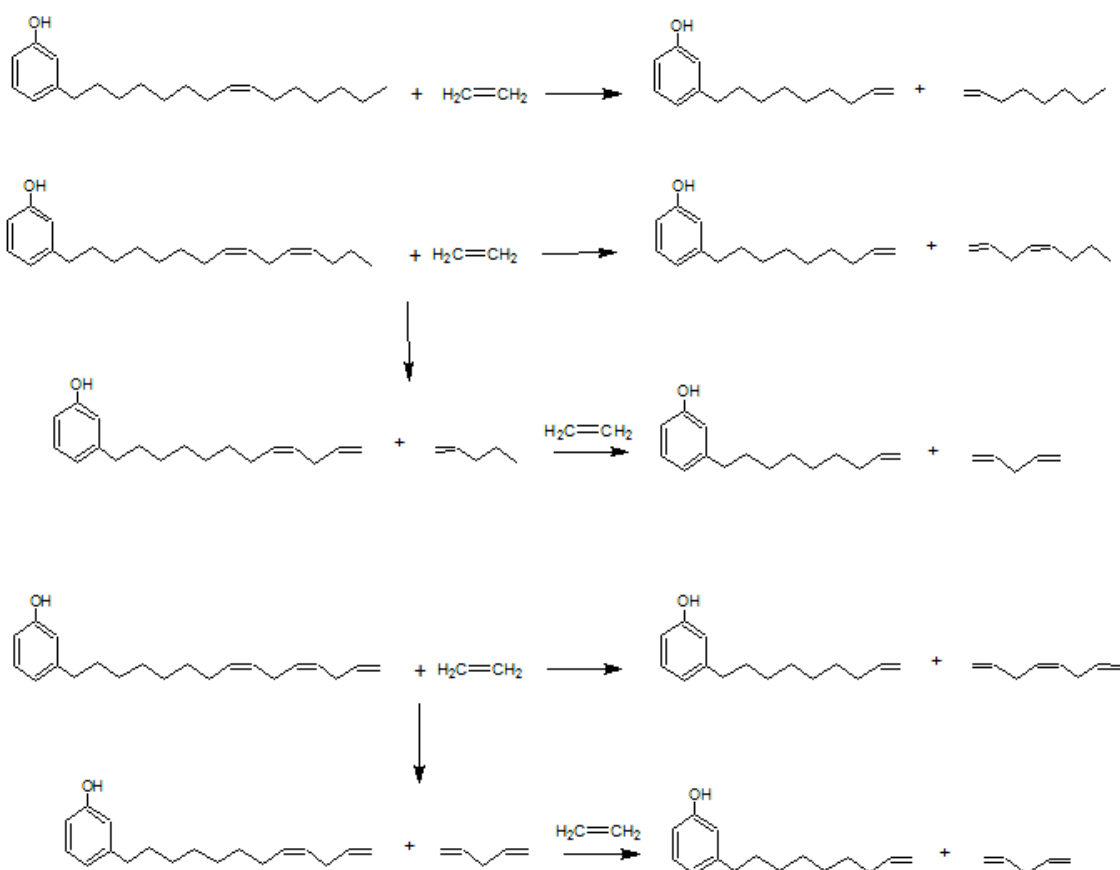


Obrázek 8 Struktura Zhanova katalyzátoru [75]

3.3.2 Metateze kardanolů - ethenolýza

Ethenolýza byla prováděna ve Shlenkově nádobě za podmínek nedávno popsanych v literatuře [76]. Reakce (viz Obrázek 9) byla prováděna dvakrát: poprvé poměr ZK a kardanolu činil při 1 : 250 a podruhé byl poměr zvýšen na 1 : 100. Po ukončení reakce byla směs katalyzátoru a produktu v toluenu separována na koloně naplněné přibližně 400 g silikagelu. Kolona byla promyta nejprve cca 300 ml toluenu a poté cca 200 ml směsí dichlormethanu a toluenu (2 : 3). Následně byla rozpouštědla odpařena na vakuové odparce. Nažloutlý odparek byl destilován ve vakuové destilační aparatuře Büchi

B-585. Počáteční teplota destilace byla 80 °C. Každých 30 minut se teplota zvýšila o 20 °C až na konečnou teplotu destilace 200 °C. Výsledná destilační frakce byla bezbarvá.



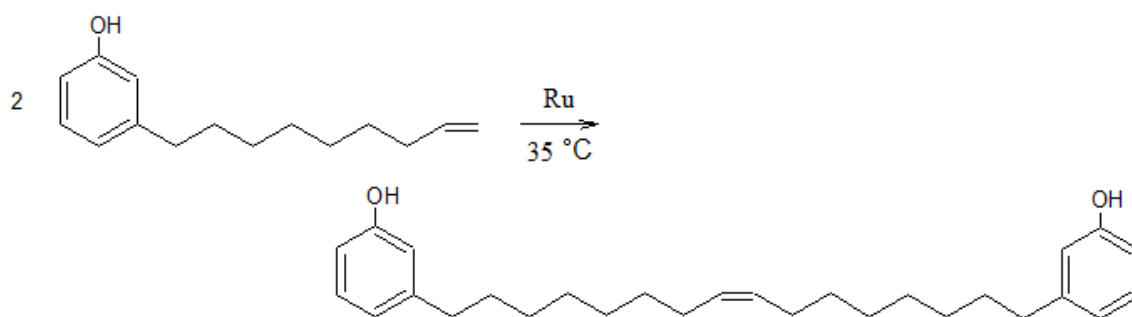
Obrázek 9 Schéma ethenolýzy směsi kardanolů

Produktem ethenolýzy je 3-(non-8-en-1-yl)fenol, který byl analyzován metodou HPLC/MS v průběhu úprav: ihned po ukončení reakce, po separaci na koloně, po odpaření rozpouštědel a po destilaci.

Konverze byla přibližně 45 %.

3.3.3 Metateze 3-(non-8-en-1-yl)fenolu

Metateze 3-(non-8-en-1-yl)fenolu (viz Obrázek 10) byla provedena ve Shlenkově nádobě za konstantního tlaku argonu 97,33 kPa. Poměr ZK a 3-(non-8-en-1-yl)fenolu byl 1 : 50 a koncentrace 3-(non-8-en-1-yl)fenolu byla $0,6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Směs ZK, 3-(non-8-en-1-yl)fenolu a toluenu, který byl předtím přečištěn dle publikovaného postupu [76], byla zahřívána na olejové lázni a udržována při teplotě $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3,5 h.



Obrázek 10 Schéma metateze 3-(non-8-en-1-yl)fenolu

Po skončení reakce byla směs separována na silikagelové koloně. Jednotlivé složky směsi byly z kolony postupně eluovány toluenem (cca 600 ml), dichlormethanem (cca 300 ml) a diethyletherem (cca 150 ml). Analýza vzorků produktů metateze odebraných v průběhu zpracování byla provedena na přístroji HPLC/MS. Produkt metateze byl dále charakterizován pomocí EI-MS, UV/VIS spektroskopie, IR a Ramanovy spektroskopie a metody NMR.

Metateze byla opakována s poměrem ZK a 3-(non-8-en-1-yl)fenolu 1 : 25. Reakce probíhala při stálé teplotě 60 °C po dobu 3 h.

3.3.4 Sběr frakcí pro měření Ramanových spekter

Pro preparativní separaci hlavních složek bifenolického standardu byl použit stejný přístroj HPLC (Waters, viz 3.2.1), stejná kolona a stejné experimentální podmínky jako v případě analytických měření. Pouze 5 μl dávkovací smyčka byla nahrazena smyčkou o objemu 50 μl . Na kolonu byl nadávkován roztok 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylbifenolu o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Ve vzorku převažovaly dvě složky (viz Obrázek 13, retenční časy 13,768 min a 14,152 min), pravděpodobně *cis* a *trans* izomery 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylbifenolu, které byly po průchodu UV detektorem manuálně odebrány do skleněných 1,5ml vialek. Tento postup byl opakován čtyřikrát.

Nasbírané frakce byly poté zakoncentrovány na objem cca 200 μl odpařením mobilní fáze za sníženého tlaku.

3.3.5 Měření Ramanových spekter

Pro analýzu Ramanovou spektroskopií bylo použito 5 μl zakoncentrovaných frakcí, které byly nanесeny na terčík (hliníková fólie), z něhož se rozpouštědlo samovolně během několika minut odpařilo. Tímto způsobem se na terčíku vytvořily mikroskopické krystaly. Ramanova spektra pak byla získána rozptylem laserového paprsku na jednom z těchto krystalů.

3.4 Studie mechanismu lokalizace dvojné vazby

První pokusy s modelovými olefiny probíhaly přímým nástřikem roztoku modelového olefinu v acetonitrilu do APCI iontového zdroje ve snaze co nejvíce napodobit podmínky metody lokalizace dvojné vazby lipidických látek acetonitrilovou APCI-MS [8; 72; 74]. Intenzita aduktů $[M + 55]^{+}$ byla ale při této metodě tak nízká, že v hmotnostním spektru bylo kromě aduktu $[M + 55]^{+}$ i velké množství okolních satelitních píků, a tak byl navržen jiný postup pro zkoumání modelových olefinů.

Navržený postup spočíval v napouštění čistého acetonitrilu do iontového zdroje APCI s průtokem acetonitrilu $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Následně byl prvním kvadrupólem vybrán ze směsi iontů jeden určitý kationt (m/z 54, 55 nebo 56), který byl dále zaveden do T-wave srážkové cely, kde reagoval s neutrálním plynem (tlak 500 Pa) modelové molekuly olefinu: ethylenu, propenu, isobutenu a izomerů hexenu (hex-1-en, *cis*-hex-2-en, *trans*-hex-2-en a hex-3-en). Druhým kvadrupólem pak byla detekována spektra v rozsahu m/z 200 – 400.

4 Výsledky a diskuze

První část výsledků je věnována analýze produktů ethenolýzy a metateze a jejich charakterizací pomocí metod HPLC/MS, MS/MS, EI-MS, UV/VIS, IR, Ramanovy a NMR spektroskopie.

Druhá část je pak věnována výsledkům studie lokalizace dvojné vazby pomocí metod MS a MS/MS. Studie byla prováděna s ethylenem, izomery hexenu, propenem a izobutenem.

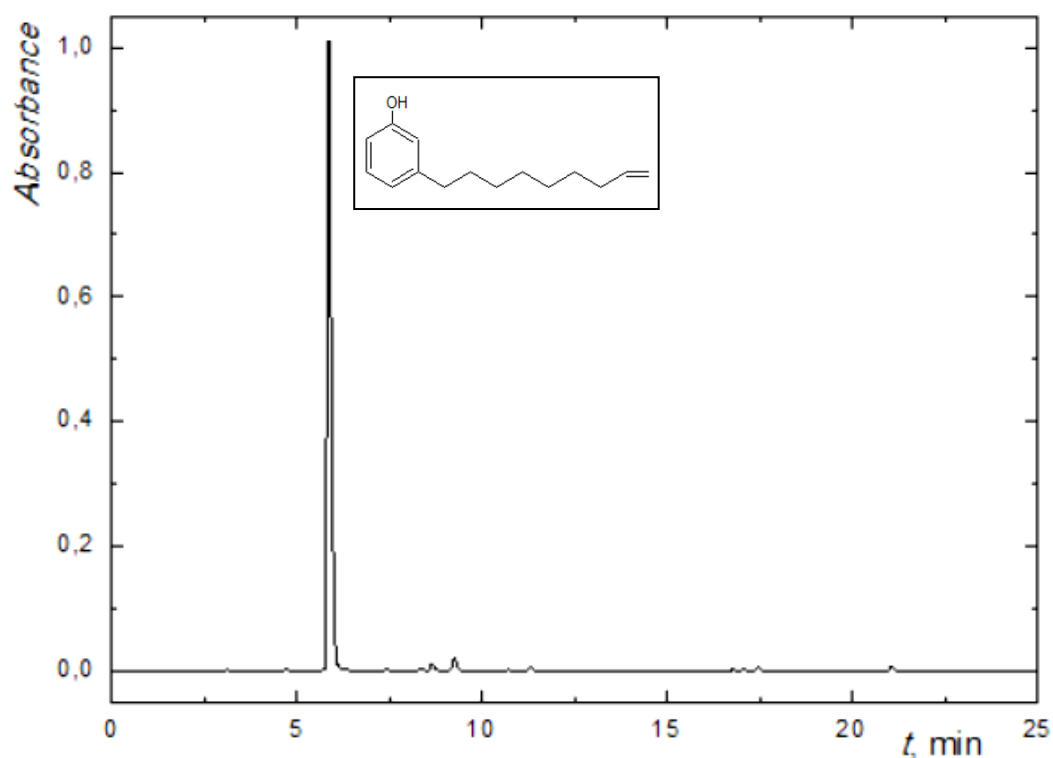
4.1 Analýza standardu

4.1.1 Optimalizace podmínek HPLC

Metoda HPLC založená na izokratické eluci a používaná v publikaci [76], byla optimalizována pro měření produktů metateze kardanolů zavedením gradientové eluce. Izokratická eluce měla několik nevýhod: dlouhou dobu analýzy, široké píky a nižší citlivost. Zavedením gradientu se nevýhody odstranily, přičemž se doba analýzy zkrátila téměř na polovinu.

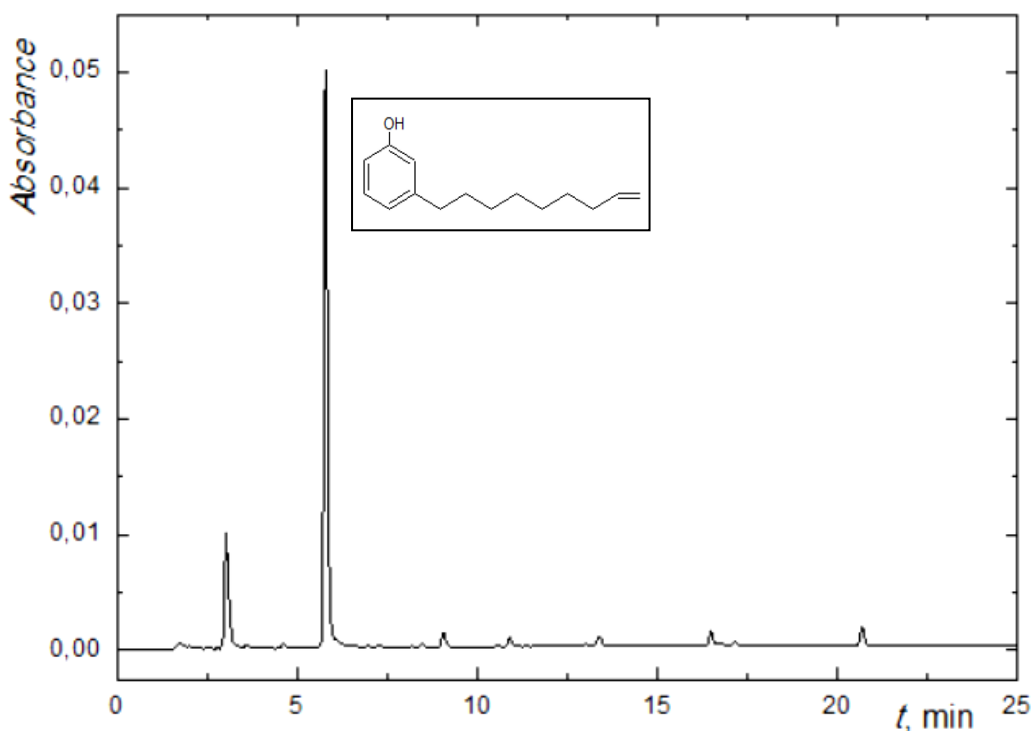
4.1.2 HPLC/MS

Na chromatogramu (viz Obrázek 11) vzorku odebraného po ethenolýze s poměrem ZK a kardanolu 1 : 250 převažuje produkt identifikovaný jako 3-(non-8-en-1-yl)fenol (m/z 218) s retenčním časem 5,868 min.



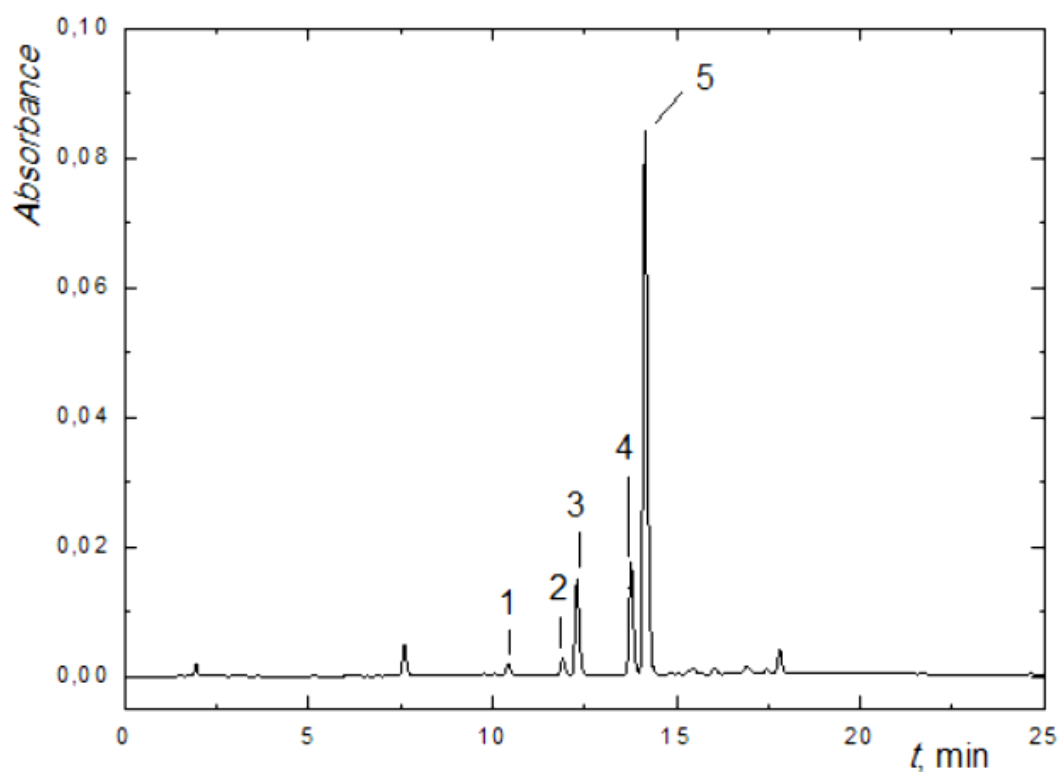
Obrázek 11 UV chromatogram ($\lambda = 280$ nm) 3-(non-8-en-1-yl)fenolu po etenolýze (1 : 250) a po vakuové destilaci

Produkt 3-(non-8-en-1-yl)fenol druhého pokusu etenolýzy (viz Obrázek 12), při kterém bylo použito více katalyzátoru za jiných reakčních podmínek, má nižší intenzitu než produkt prvního pokusu. Produkt druhého pokusu nebyl přečištěn vakuovou destilací, což je příčinou zbytku rozpouštědla (toluenu) viditelného na chromatogramu v čase 3,04 min.



Obrázek 12 UV chromatogram ($\lambda = 280$ nm) 3-(non-8-en-1-yl)fenolu po ethenolýze (1 : 100)

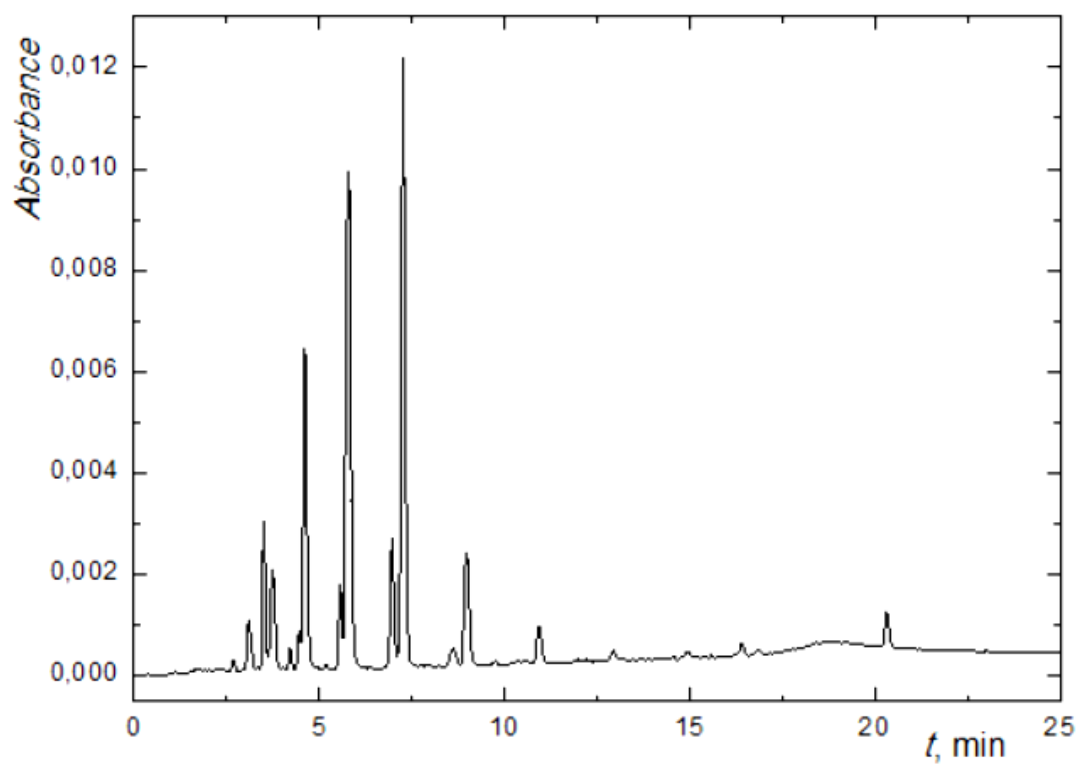
Bifenolický standard, který byl syntetizován homometatezí 3-(non-8-en-1-yl)fenolu, se na chromatogramu (viz Obrázek 13) objevil ve dvou frakcích v retenčních časech 13,768 min a 14,152 min (**4**) a (**5**). Jak bylo později potvrzeno Ramanovou spektroskopií (viz 4.1.6), jedná se o *cis* a *trans* izomery dané látky, z čehož kvantitativně převažuje izomer *trans*. Dále jsou na chromatogramu zřetelné píky homologické sloučeniny kratší o $-\text{CH}_2$ skupinu. Tento homolog také vytváří *cis* a *trans* izomery s retenčními časy 12,218 min a 12,302 min (**2**) a (**3**). Další homolog kratší o $-(\text{CH}_2)_2$ skupinu je zastoupen ve velmi malém množství, ale přesto je patrný pík v retenčním čase 10,435 min (**1**).



Obrázek 13 UV chromatogram ($\lambda = 280$ nm) produktů metateze (1 : 50) s píky odpovídajícími iontům **(1)** m/z 379, **(2)**, **(3)** m/z 393 a **(4)**, **(5)** m/z 407 v hmotnostním spektru

Z grafu vyplývá, že těsně před metatezí nebo během ní se dvojná vazba může na řetězci posouvat a tím tak mohou vznikat sloučeniny s řetězcem kratším o $-(CH_2)_n$ skupiny.

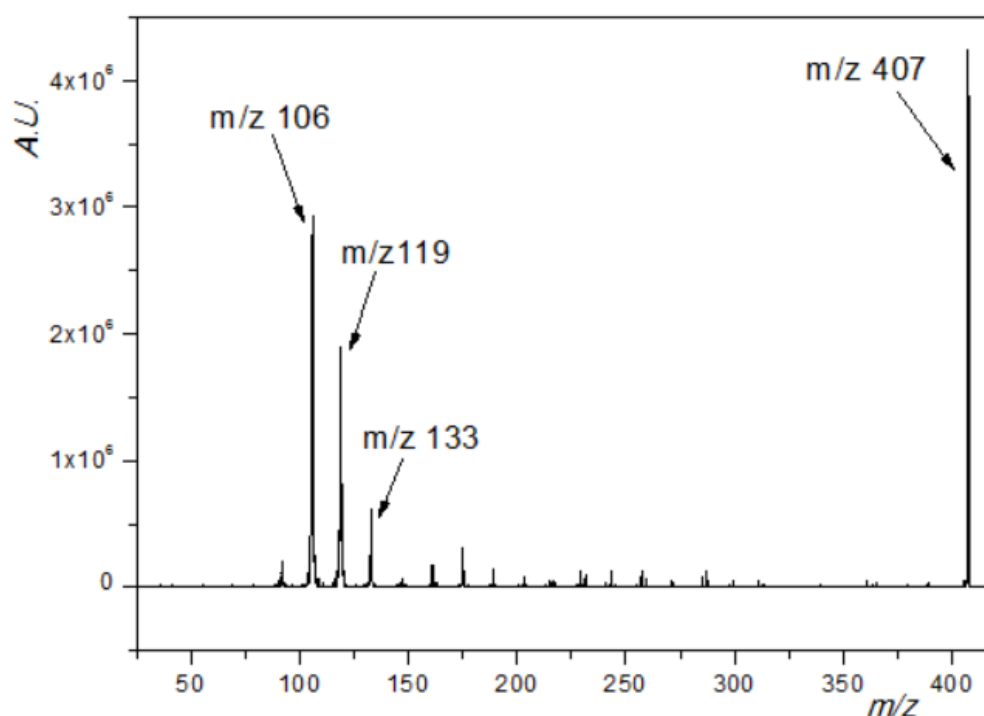
Při reakci s extrémnějšími podmínkami (s větším množstvím katalyzátoru a při vyšší teplotě) vzniklo více nižších homologů než při podmínkách prvního pokusu metateze (viz Obrázek 14). Z toho vyplývá, že při podmínkách podporujících reakci podléhají produkty znovu a znovu metatezi, přičemž se řetězec zkracuje o jednu nebo o více methylenových skupin.



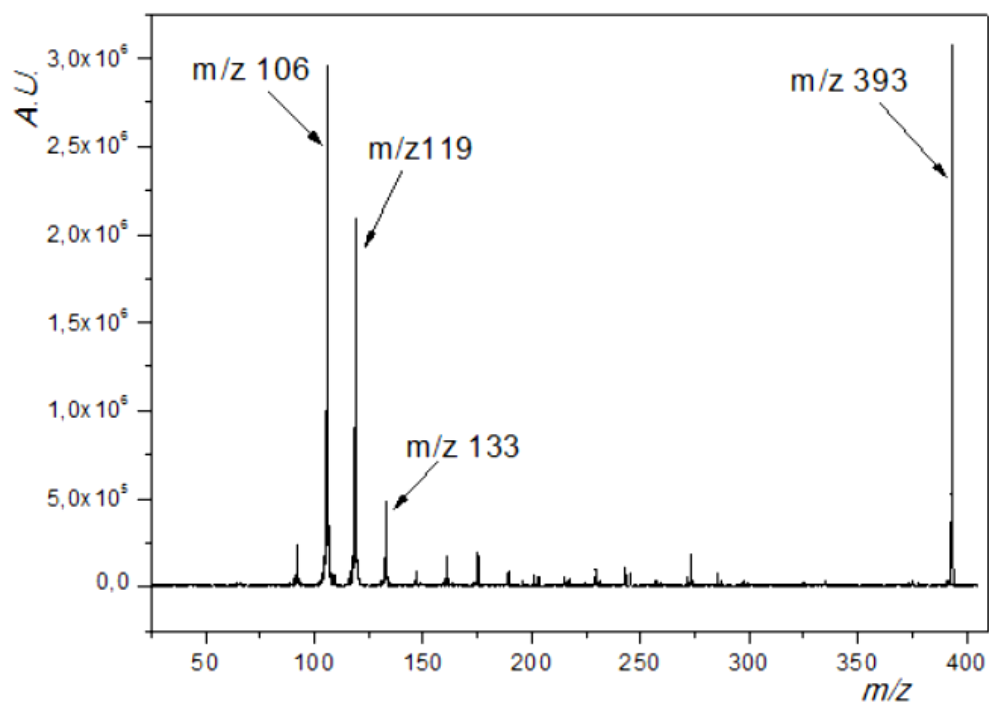
Obrázek 14 UV chromatogram ($\lambda = 280$ nm) produktů metateze (1 : 25)

4.1.3 MS/MS

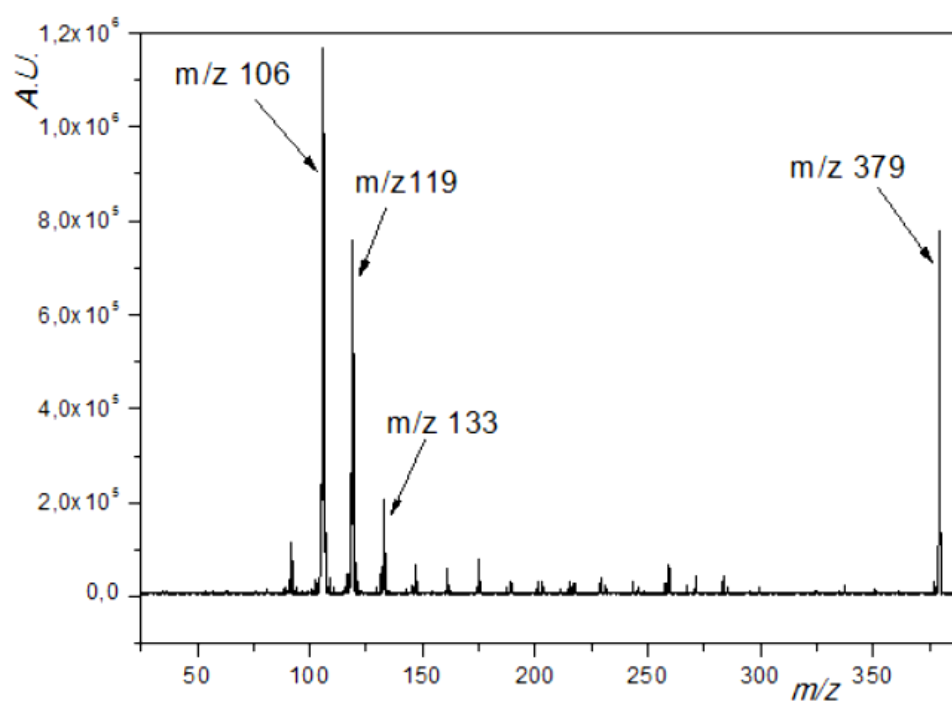
Jednotlivé frakce z analýzy HPLC bifenolického standardu byly charakterizovány pomocí metody MS/MS. Ion m/z 407 se rozpadá na ionty m/z 106, 119 a 133 (viz Obrázek 15). Vzhledem k tomu, že ionty m/z 393 a 379 jsou homology iontu m/z 407 kratší o jednu nebo o dvě $-\text{CH}_2$ skupiny, na kolizních spektrech jsou výrazné stejné fragmenty jako pro bifenolický standard (viz Obrázek 16 a Obrázek 17).



Obrázek 15 CID spektrum (Ar, 1 Pa, 40 eV) iontu $(\text{M-H})^-$ 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu



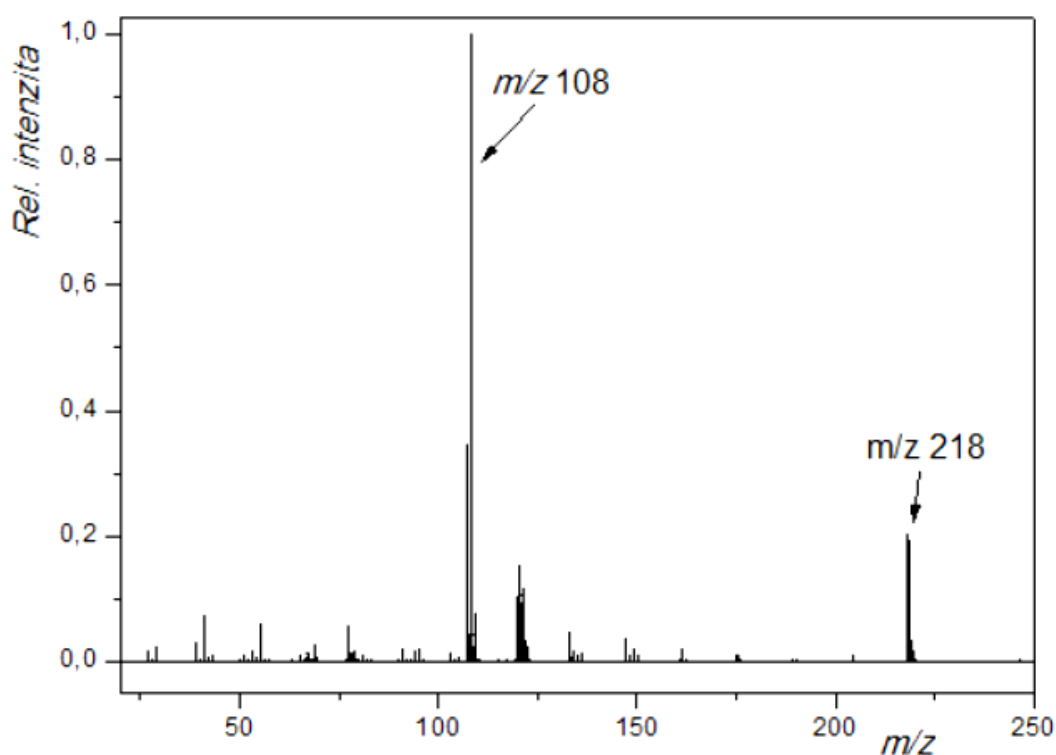
Obrázek 16 CID spektrum (Ar, 1 Pa, 40 eV) iontu $(M-H)^-$ 3,3'-pentadec-7-en-1,15-diylidifenolu



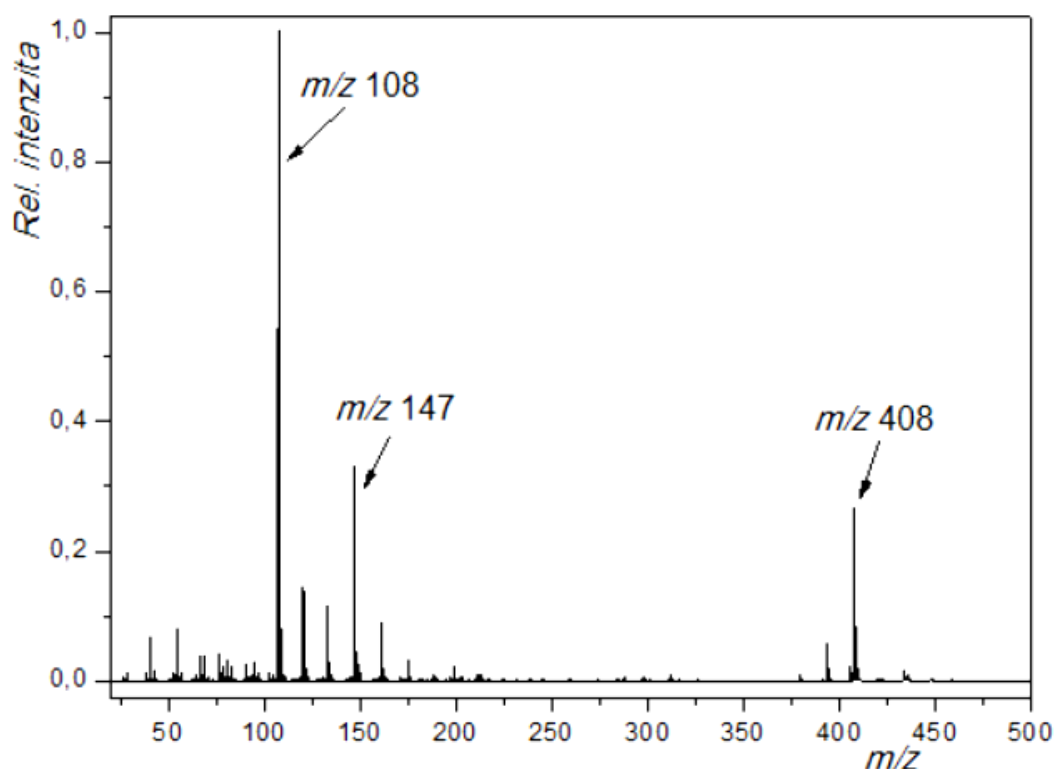
Obrázek 17 CID spektrum (Ar, 1 Pa, 40 eV) iontu $(M-H)^-$ 3,3'-tetradec-7-en-1,14-diylidifenolu

Metoda MS/MS byla použita také v průběhu analýzy HPLC bifenolického standardu. Pro dvojice píků z chromatogramu produktů metateze (viz Obrázek 13) označených jako (2), (3) a (4), (5) byla změřena CID spektra. Spektrum píku (2) bylo totožné se spektrem píku (3). Totéž platilo pro spektra druhé dvojice píků (4) a (5). Přítomnost dvojic frakcí separovaných na koloně HPLC a zároveň totožnost jejich CID spekter může napovídat o možné *cis/trans* izomerii bifenolického standardu a jeho kratších homologů.

4.1.4 EI-MS



Obrázek 18 Hmotnostní spektrum EI-MS standardu 3-(non-8-en-1-yl)fenolu



Obrázek 19 Hmotnostní spektrum EI-MS standardu 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu

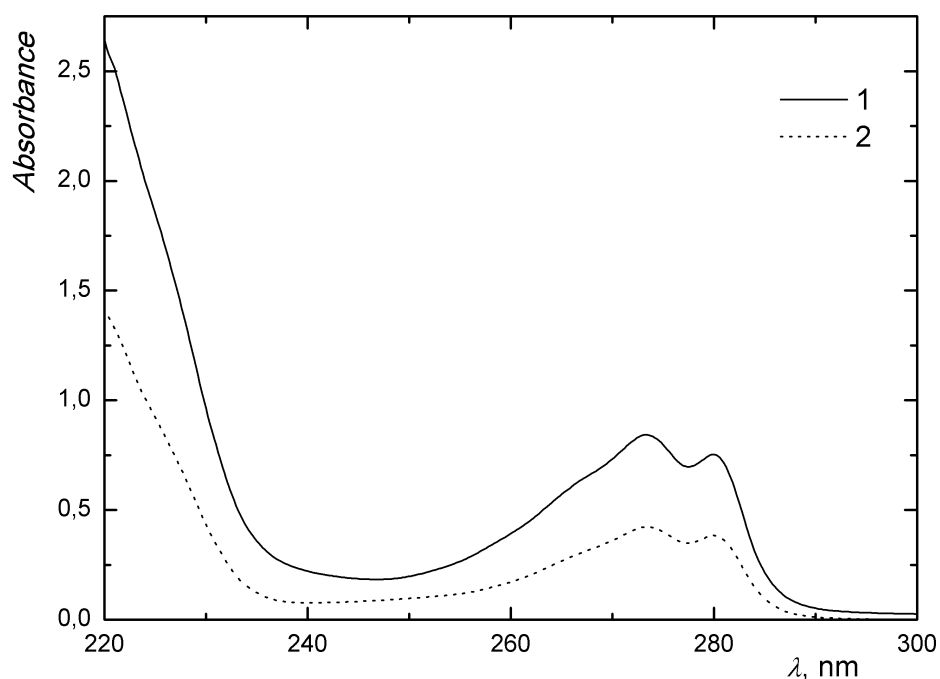
Hmotnostní spektrum EI-MS 3-(non-8-en-1-yl)fenolu (viz Obrázek 18) je stejné jako nedávno publikované spektrum [77].

Na hmotnostním spektru 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu lze pozorovat vznikající kratší homology bifenolického standardu s m/z 394 a m/z 380 (viz Obrázek 19). Poměry píků m/z 408, 394 a 380 v hmotnostním spektru EI-MS přibližně odpovídají poměrům píků (5) a (4), (3) a (2) a (1) v HPLC chromatogramu (viz Obrázek 13).

4.1.5 UV/VIS spektra

Na grafu (viz Obrázek 20) je UV/VIS spektrum 3-(non-8-en-1-yl)fenolu a 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu. Maxima píků jsou ve vlnových délkách 273 a 280 nm.

Vzorek 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu se stejnou koncentrací jako vzorek 3-(non-8-en-1-yl)fenolu absorboval záření v UV oblasti dvojnásobně.



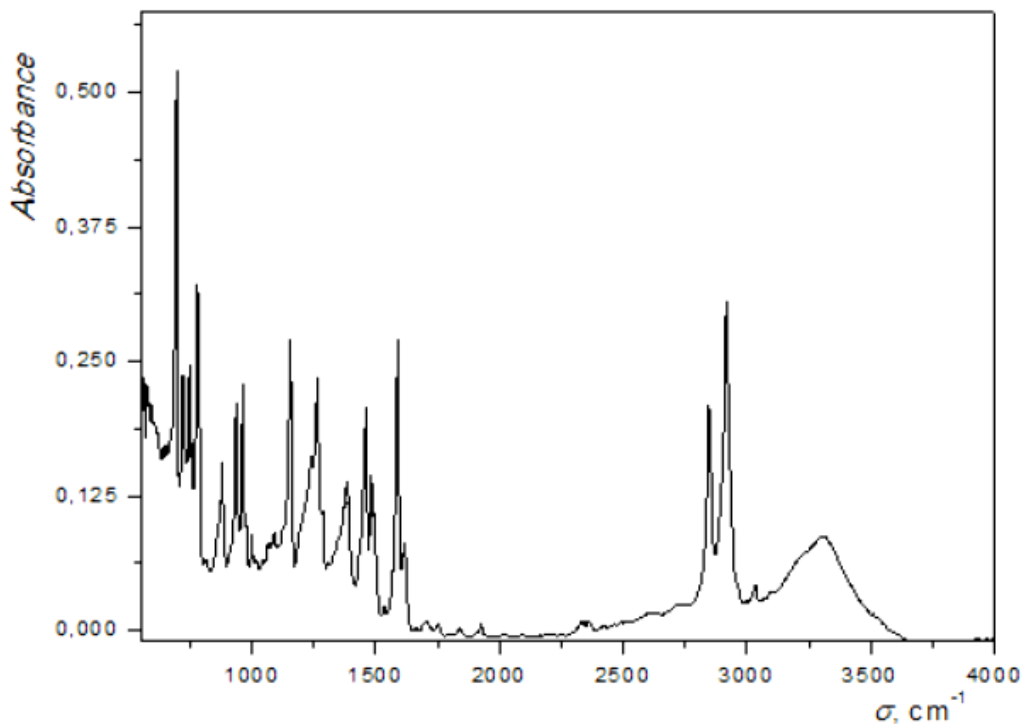
Obrázek 20 UV/VIS spektrum standardů: (1) 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu ($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a (2) 3-(non-8-en-1-yl)fenolu ($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Ze změřených absorbancí a určených hodnot maxim byly spočítány extinkční koeficienty obou látek. Extinkční koeficienty standardu 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu činí $3389 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro vlnovou délku 273 nm a $3024 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro vlnovou délku 280 nm. Extinkční koeficienty standardu 3-(non-8-en-1-yl)fenolu činí $1692 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro vlnovou délku 273 nm a $1536 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro vlnovou délku 280 nm.

Poměry molárních extinkčních koeficientů monofenolického a bifenolického standardu jsou pro vlnovou délku 273 nm 0,50 a pro vlnovou délku 280 nm 0,51. Z toho lze usoudit, že extinkční koeficienty jsou v tomto případě za daných podmínek aditivní, a že se oba chromofory v molekule 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenolu pravděpodobně vzájemně neovlivňují.

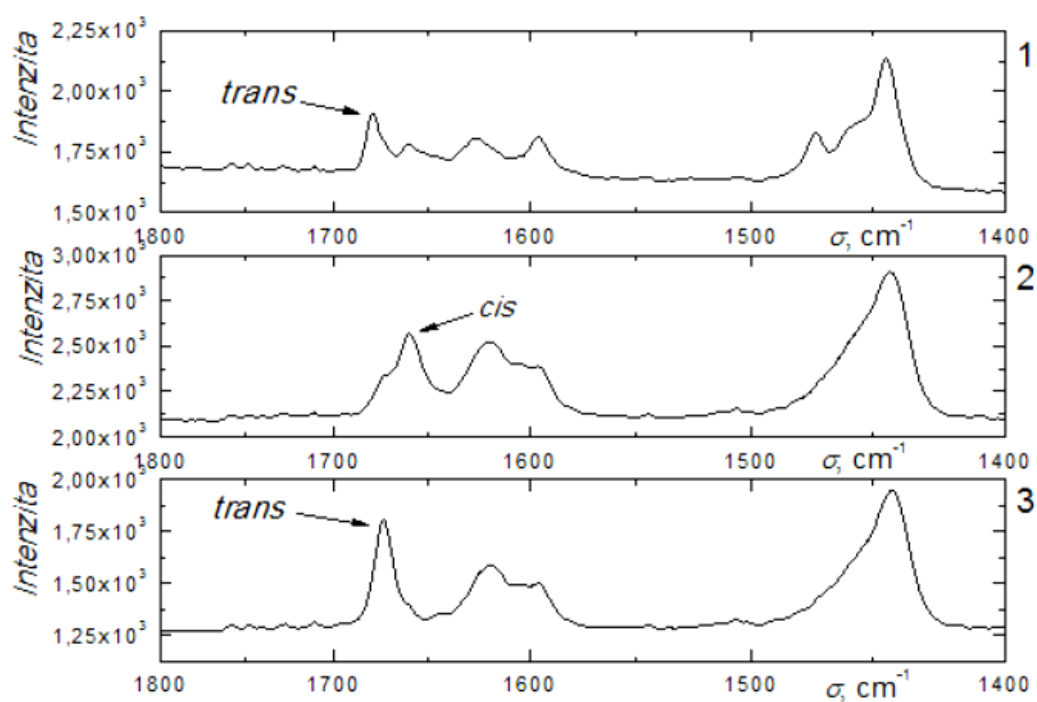
4.1.6 IR a Ramanova spektra

Na IR spektru (viz Obrázek 21) lze rozpoznat funkční skupiny OH a alifatické skupiny CH₂. Skupiny OH navázané na aromatické jádro odpovídají frekvenci v rozmezí 1410 – 1310 cm⁻¹.



Obrázek 21 IR spektrum standardu 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diyl-diphenolu

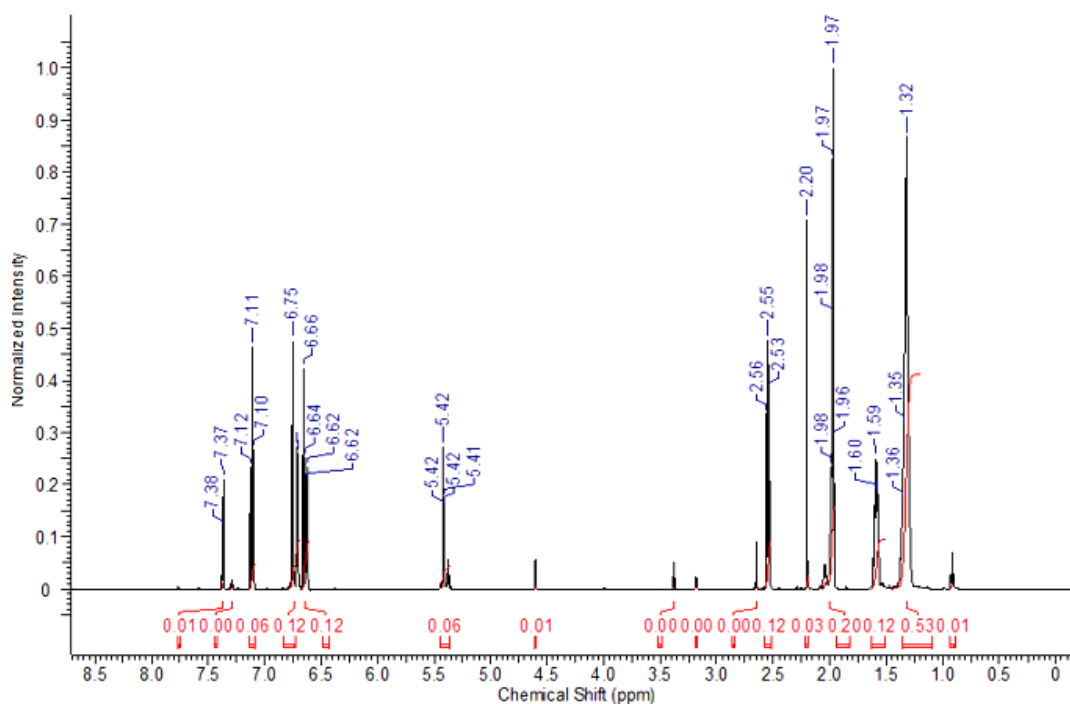
Ramanova spektra obou frakcí získaných separací na chromatografické koloně se liší v oblasti valenční vibrace dvojné vazby (viz Obrázek 22). Rozlišení *cis* a *trans* izomerů pomocí Ramanovy spektroskopie bylo již v literatuře popsáno, například u kyseliny olejové [78]. V této publikaci autoři popsali valenční vibraci *cis* dvojné vazby při vlnětu 1656 cm⁻¹, zatímco pro *trans* dvojnou vazbu byl vlnětet 1671 cm⁻¹. Analogicky byly analyzovány dvě frakce 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diyl-diphenolu separované na HPLC koloně. Méně zastoupená frakce se projevila ve spektru při vlnětu 1659 cm⁻¹, který odpovídá *cis* izomerii. Více zastoupená frakce měla vlnětet 1672 cm⁻¹, čímž jí byla přiřazena izomerie *trans*.



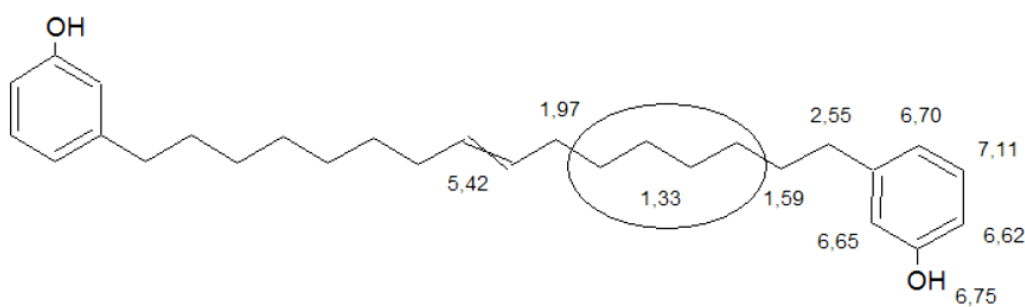
Obrázek 22 Ramanovo spektrum: (1) směsi *cis* a *trans* izomerů bifenolického standardu, (2) frakce *cis* izomeru a (3) frakce *trans* izomeru

4.1.7 NMR

V grafu ^1H NMR spektra se projevují posuny vodíků některých částí molekuly 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diyldifenolu (viz Obrázek 23 a Obrázek 24). Na první pohled lze vidět protony na dvojně vazbě (5,42 ppm), skupinu OH (6,75 ppm) a alifatickou část představuje intenzivní nedokonale rozlišený multiplet při 1,33 ppm.



Obrázek 23 ^1H NMR spektrum 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diyldifenolu

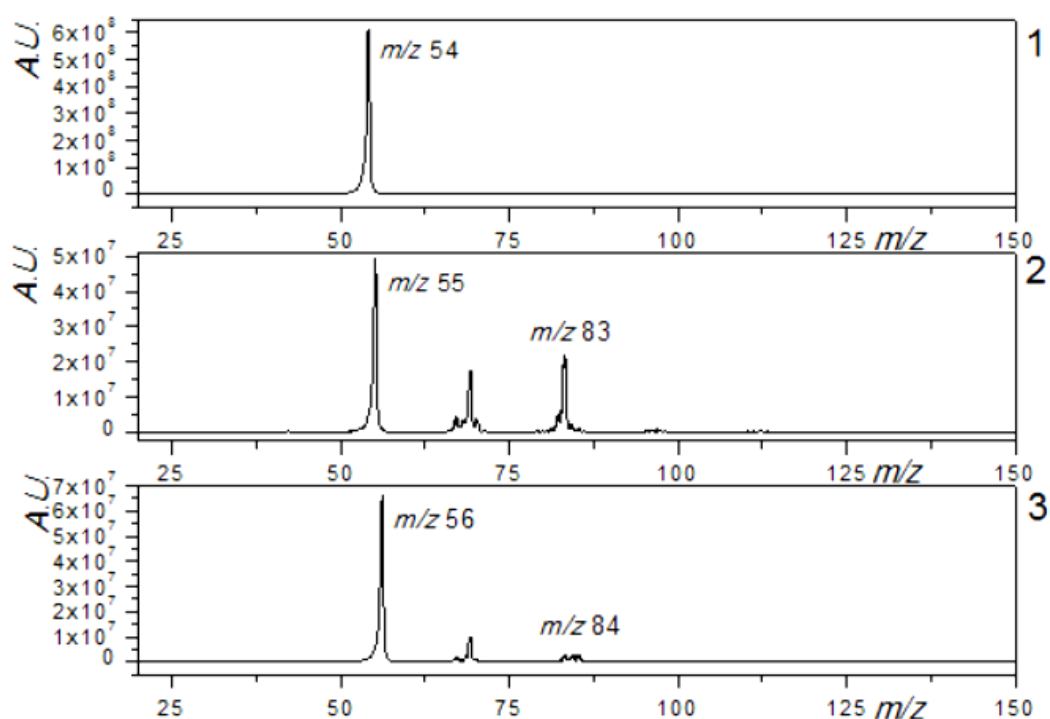


Obrázek 24 Hodnoty posunů signálů a jejich přiřazení v ^1H NMR spektru 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diyldifenolu

4.2 Studie mechanismu lokalizace dvojné vazby

4.2.1 Ethylen

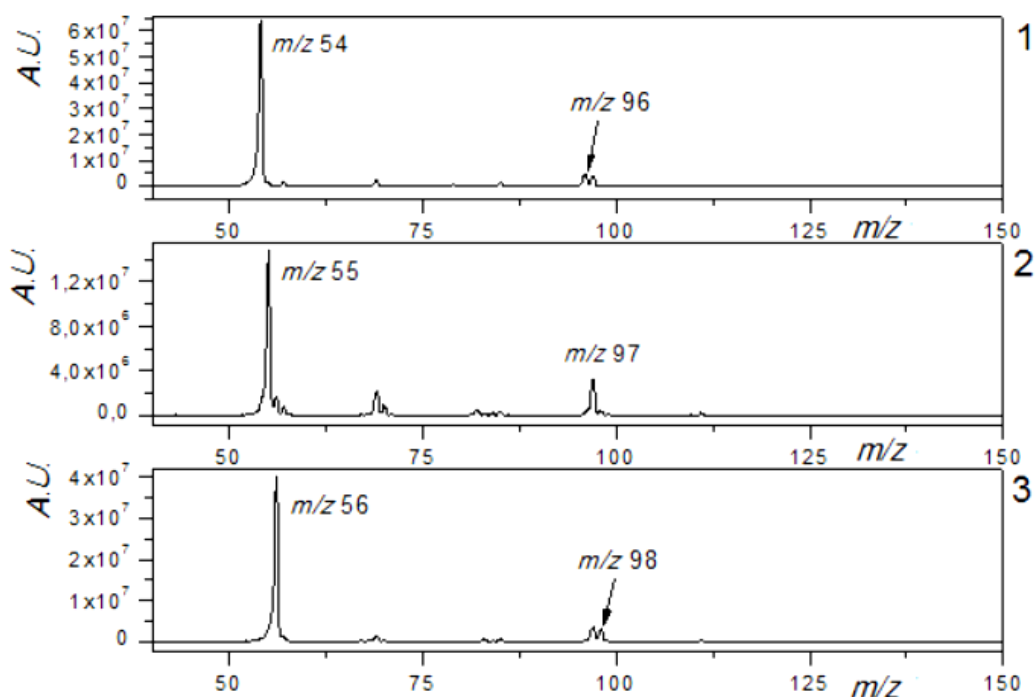
Iont m/z 55 byl ze směsi iontů vznikajících ve zdroji APCI vybrán kvadrupólem a poté reagoval s neutrálními molekulami ethyleny za vzniku aduktu $[M + 55]^+$ s m/z 83 (viz Obrázek 25). Stejný experiment byl opakován s vybranými ionty m/z 54 a m/z 56. Adukt $[M + 54]^+$ se nevytváří, jak lze vidět ve spektru (1), a adukt $[M + 56]^+$ vzniká jen s velmi malou intenzitou (spektrum (3)).



Obrázek 25 Hmotnostní spektra produktů reakce ethyleny s vybraným: (1) iontem m/z 54, (2) iontem m/z 55 a (3) iontem m/z 56

4.2.2 Propen

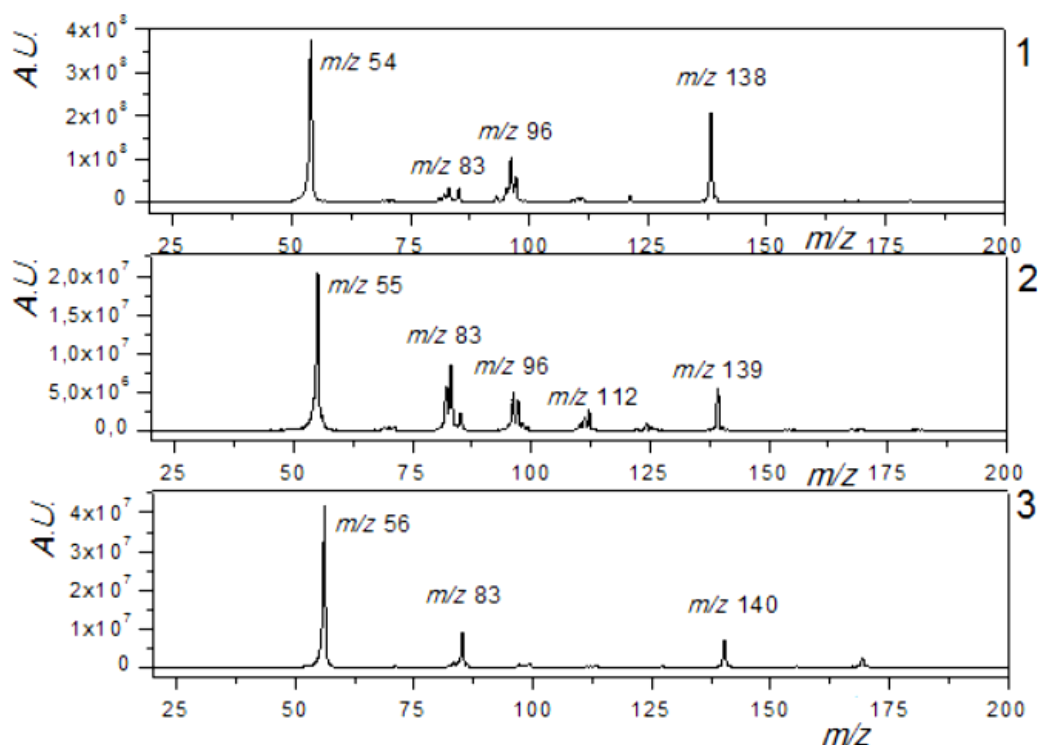
Propen reaguje s iontem m/z 54 a vytváří tak adukt $[M + 54]^+$ s velmi malou intenzitou. Přibližně stejnou intenzitu má adukt s iontem m/z 56. S iontem m/z 55 reaguje propen lépe za vzniku aduktu $[M + 55]^+$ s m/z 97.



Obrázek 26 Grafy produktů reakce propenu s vybraným: **(1)** iontem m/z 54, **(2)** iontem m/z 55 a **(3)** iontem m/z 56

4.2.3 Hexeny

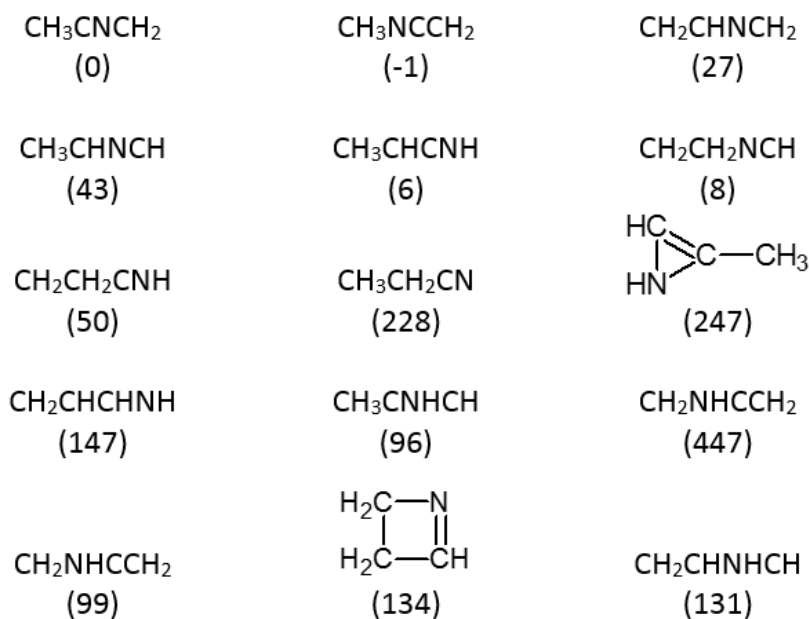
Hex-1-en projevil poměrně vysokou reaktivitu ze zkoumaných látek s vybranými ionty. S iontem m/z 54 ochotně reaguje za vzniku aduktu s m/z 138. Reaktivita je nižší s iontem m/z 55, ale přesto je viditelný pík aduktu s m/z 139. Pík aduktu $[M + 56]^+$ s m/z 140 má téměř stejnou intenzitu jako pík aduktu $[M + 55]^+$.



Obrázek 27 Grafy produktů reakce hex-1-enu s vybraným: (1) iontem m/z 54, (2) iontem m/z 55 a (3) iontem m/z 56

Přestože má iont m/z 55 nízkou intenzitu v porovnání s ionty m/z 54 a 65 vytvářenými v APCI iontovém zdroji, provedenými experimenty bylo prokázáno, že iont m/z 55 tvoří s nenasycenými sloučeninami adukt $[M + 55]^+$. Vysvětlením jeho zvýšené reaktivity je pravděpodobně to, že se jedná o kation-radikál, s čímž je převážně spojena nestabilita a vyšší schopnost interakce než u ostatních typů iontů.

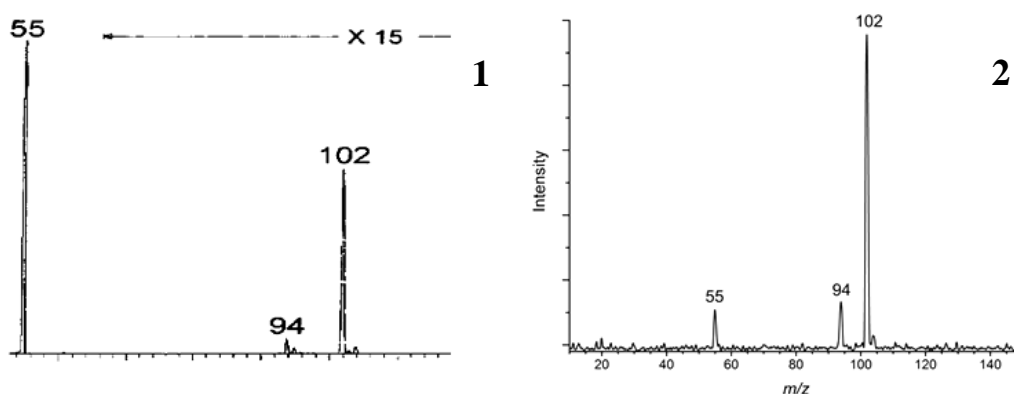
Jak bylo zmíněno v teoretickém úvodu, elementární složení iontu m/z 55 odpovídá C_3H_5N . Z výpočtů potenciálních energií pro 15 cyklických a necyklických C_3H_5N izomerů (viz Obrázek 28) vyplývá, že nejstabilnějšími strukturami jsou N-methylidacetonitril $[CH_3CNCH_2]^+$ ($\Delta E^0 = 0$) a N-methylketenimin $[CH_3NCCH_2]^+$ ($\Delta E^0 = -1$) [79].



Obrázek 28 Hodnoty potenciálních energií zkoumaných struktur izomerů se složením $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ [79]

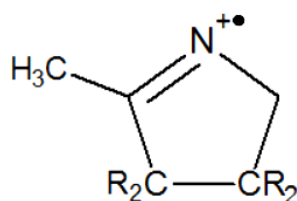
Studie reakcí iontů $[\text{CH}_3\text{CNCH}_2]^+$ a $[\text{CH}_3\text{NCCH}_2]^+$ byla provedena o rok později v roce 1999. [80] Ionty byly připraveny iontově molekulárními reakcemi mezi ionizovaným cyklobutanonem nebo ketenem a acetonitrilem nebo methylizokyanidem a následně byla naměřena hmotnostní spektra produktů reakcí daných iontů s dimethyldisulfidem. Hmotnostní spektra produktů této reakce se pro oba ionty $[\text{CH}_3\text{CNCH}_2]^+$ a $[\text{CH}_3\text{NCCH}_2]^+$ lišila.

Stejný experiment reakce s dimethyldisulfidem (DMDS) byl proveden za účelem získání kvalitativní informace o iontu s elementárním složením $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ pocházejícího z acetonitrilu v plynné fázi přímo v iontovém zdroji APCI. Identifikace iontu s elementárním složením $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ proběhla na základě porovnání nově naměřených hmotnostních spekter s hmotnostními spektry z předchozího (viz Obrázek 29) [80]. Iont $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ pocházející z acetonitrilu v plynné fázi v iontovém zdroji APCI má strukturu $[\text{CH}_3\text{CNCH}_2]^+$ [81].



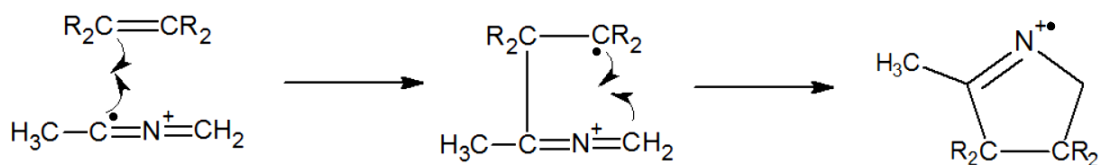
Obrázek 29 Porovnání grafů hmotnostních spekter produktů reakcí: **(1)** připraveného $\text{CH}_3\text{CNCH}_2^{+\bullet}$ s DMDS [80] a **(2)** $\text{CH}_3\text{CNCH}_2^{+\bullet}$ z acetonitrilové APCI s DMDS

Teoretickými výpočty byla navrhována struktura aduktu nenasycené sloučeniny M s iontem m/z 55 $[\text{CH}_3\text{CNCH}_2]^{+\bullet}$. Základem navržené struktury je 2-methylpyrrolidin (viz Obrázek 30).



Obrázek 30 Struktura aduktu $[\text{M} + 55]^{+\bullet}$

Dále byl navržen možný mechanismus vzniku aduktu. Kation-radikál $[\text{CH}_3\text{CNCH}_2]^{+\bullet}$ naruší dvojnou vazbu molekuly nenasycené sloučeniny. Nově vznikajícími vazbami se molekuly zacyklí do struktury 2-methylpyrrolidinu (viz Obrázek 31).



Obrázek 31 Schéma mechanismu vzniku aduktu $[\text{M} + 55]^{+\bullet}$

5 Závěr

Pro analýzu produktů metateze kardanolů byla optimalizována metoda HPLC/MS založená na použití gradientové eluce s mobilními fázemi acetonitril/voda s přidavkem 0,05% kyseliny mravenčí.

Monofenolický standard, 3-(non-8-en-1-yl)fenol, byl připraven kometatezí kardanolů s ethylenem (ethenolýzou) za působení Zhanova katalyzátoru. Bifenolický standard 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenol byl připraven homometatezí 3-(non-8-en-1-yl)fenolu se stejným katalyzátorem jako u ethenolýzy. Stupeň konverze byl přibližně 45 %. Standard 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenol je nově připravená, v literatuře ještě nepopsaná látka, a proto byla dále charakterizována pomocí metod HPLC/MS, MS/MS, EI-MS, UV/VIS, IR, Ramanovy a NMR spektroskopie. Bifenolický standard byl připraven jako směs *cis* a *trans* izomerů, které byly preparativně separovány. Frakce *cis* a *trans* izomeru 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenu byly identifikovány pomocí Ramanovy spektroskopie, přičemž se ukázalo, že *trans* izomer ve směsi převažuje.

Standardy 3-(non-8-en-1-yl)fenol a 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenol byly charakterizovány také pomocí spektrometrie UV/VIS a pro obě látky byly stanoveny hodnoty extinkčních koeficientů při vlnových délkách 273 nm a 280 nm. Poměry extinkčních koeficientů 3-(non-8-en-1-yl)fenolu a 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenu naznačují, že jsou v tomto případě a za daných podmínek koeficienty aditivní, a že se oba chromofory v molekule 3,3'-hexadec-8-en-1,16-diylidifenu pravděpodobně vzájemně neovlivňují.

Modelová studie zaměřená na objasnění molekulárního mechanismu tvorby aduktů, na nichž je založena metoda lokalizace dvojných vazeb pomocí metody APCI-MS s použitím acetonitrilu, byla provedena na ethylenu, izomerech hexenu, propenu a izobutenu. Konkrétně byla zkoumána tvorba aduktů $[M + 55]^+$. Adukty s iontem m/z 55 vytvářel velmi dobře ethylen a propen, hex-1-en vytvářel adukt s malou intenzitou a izobuten téměř vůbec. Rozdíly v tvorbě aduktu mezi *cis* a *trans* izomery hex-2-enu byly zanedbatelné. Důležitým závěrem této modelové studie je, že adukt $[M + 55]^+$ při acetonitrilové APCI olefinů vzniká adicí iontů m/z 55 na dvojnou vazbu, a to navzdory jeho velmi malému zastoupení v APCI plazmě [72].

Na základě reaktivity s DMDS byla iontům m/z 55 vznikajícím při APCI v přítomnosti acetonitrilu připsána struktura N-methylidu acetonitrilu, $[\text{CH}_3\text{CNCH}_2]^+$.

Struktura aduktu nenasycené sloučeniny M s iontem m/z 55 byla navržena jako 2-methylpyrrolidin (viz Obrázek 30) a dále byl navržen mechanismus vzniku tohoto aduktu jako adice iontu m/z 55 na dvojnou vazbu alkenů (Obrázek 31).

Reference

- [1] PHANI KUMAR, P., R. PARAMASHIVAPPA, P. J. VITHAYATHIL, P. V. SUBBA RAO, et al. Process for Isolation of Cardanol from Technical Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(16), 4705-4708.
- [2] HIMEJIMA, M. AND I. KUBO. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39(2), 418-421.
- [3] HÉRISSON, J.-L. AND Y. CHAUVIN. Catalyse de transformation des oléfines par les complexes du tungstène. II. Télomérisation des oléfines cycliques en présence d'oléfinacycliques. *Die Makromolekulare Chemie*, 1971, 141(1), 161-176.
- [4] HUANG, J., E. D. STEVENS, S. P. NOLAN AND J. L. PETERSEN. Olefin Metathesis-Active Ruthenium Complexes Bearing a Nucleophilic Carbene Ligand. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(12), 2674-2678.
- [5] KINGSBURY, J. S., J. P. A. HARRITY, P. J. BONITATEBUS AND A. H. HOVEYDA. A Recyclable Ru-Based Metathesis Catalyst. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(4), 791-799.
- [6] GRELA, K., S. HARUTYUNYAN AND A. MICHROWSKA. A Highly Efficient Ruthenium Catalyst for Metathesis Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(21), 4038-4040.
- [7] CONNON, S. J., A. M. DUNNE AND S. BLECHERT. A Self-Generating, Highly Active, and Recyclable Olefin-Metathesis Catalyst. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(20), 3835-3838.
- [8] VRKOSLAV, V., K. URBANOVÁ AND J. CVAČKA. Analysis of wax ester molecular species by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(25), 4184-4194.
- [9] GRULICH, V. *ANACARDIUM OCCIDENTALE* L. – ledvinovník západní, kešu. In.: *Botany.cz* [online]. Přírodovědná společnost, 2011. [vid. 11.04.2015]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/anacardium-occidentale/>.
- [10] SUBBARAO, C. N. V., K. M. M. KRISHNA PRASAD AND V. S. R. K. PRASAD. Review on Applications, Extraction, Isolation and Analysis of Cashew Nut Shell Liquid (CNSL). *The Pharma Research Journal*, 2011, 6(1), 21-41.
- [11] BANKS, R. L. AND G. C. BAILEY. Olefin Disproportionation. A New Catalytic Process. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 1964, 3(3), 170-173.
- [12] ELEUTERIO, H. S. German Patent 1,072,811, 1960.
- [13] ELEUTERIO, H. S. Olefin metathesis: chance favors those minds that are best prepared. *Journal of Molecular Catalysis*, 1991, 65(1-2), 55-61.
- [14] TRUETT, W. L., D. R. JOHNSON, I. M. ROBINSON AND B. A. MONTAGUE. Polynorbornene by Coördination Polymerization1. *Journal of the American Chemical Society*, 1960, 82(9), 2337-2340.
- [15] CALDERON, N., H. Y. CHEN AND K. W. SCOTT. Olefin metathesis - A novel reaction for skeletal transformations of unsaturated hydrocarbons. *Tetrahedron Letters*, 1967, 8(34), 3327-3329.

- [16] LEWANDOS, G. S. AND R. PETTIT. Mechanism of the metal-catalyzed disproportionation of olefins. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93(25), 7087-7088.
- [17] FISCHER, E. O. AND A. MAASBÖL. On the Existence of a Tungsten Carbonyl Carbene Complex. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1964, 3(8), 580-581.
- [18] NATTA, G., G. DALL'ASTA AND G. MAZZANTI. Stereospecific Homopolymerization of Cyclopentene. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1964, 3(11), 723-729.
- [19] BANKS, R. L. AND G. C. BAILEY. Olefin Disproportionation. A New Catalytic Process. *I&EC Product Research and Development*, 1964, 3(3), 170-173.
- [20] ASTRUC, D. The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments. *New Journal of Chemistry*, 2005, 29(1), 42-56.
- [21] SUTTHASUPA, S., M. SHIOTSUKI AND F. SANDA. Recent advances in ring-opening metathesis polymerization, and application to synthesis of functional materials. *Polym J*, 2010, 42(12), 905-915.
- [22] CASEY, C. P. AND T. J. BURKHARDT. Reactions of (diphenylcarbene)pentacarbonyltungsten(0) with alkenes. Role of metal-carbene complexes in cyclopropanation and olefin metathesis reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 1974, 96(25), 7808-7809.
- [23] NATTA, G., G. DALL'ASTA AND G. MAZZANTI. Stereospezifische Homopolymerisation des Cyclopentens. *Angewandte Chemie*, 1964, 76(18), 765-772.
- [24] WILKINSON, G. The Long Search for Stable Transition Metal Alkyls. *Science*, 1974, 185(4146), 109-112.
- [25] WENGROVIUS, J. H., R. R. SCHROCK, M. R. CHURCHILL, J. R. MISSERT, et al. Multiple metal-carbon bonds. 16. Tungsten-oxo alkylidene complexes as olefins metathesis catalysts and the crystal structure of $W(O)(CHCMe_3(PEt_3)Cl_2$. *Journal of the American Chemical Society*, 1980, 102(13), 4515-4516.
- [26] KRESS, J., A. AGUERO AND J. A. OSBORN. Recent advances in the chemistry of tungsten—carbene complexes. *Journal of Molecular Catalysis*, 1986, 36(1-2), 1-12.
- [27] KRESS, J., J. A. OSBORN, R. M. E. GREENE, K. J. IVIN, et al. First direct observation of the simultaneous presence and of the interconversion of chain-propagating metal-carbene and metallacyclobutane complexes in a catalytic olefin metathesis reaction: the ring-opening polymerization of norbornene. *Journal of the American Chemical Society*, 1987, 109(3), 899-901.
- [28] KRESS, J. AND J. A. OSBORN. Tungsten carbene complexes in olefin metathesis: a cationic and chiral active species. *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105(20), 6346-6347.
- [29] KRESS, J., M. WESOLEK AND J. A. OSBORN. Tungsten (IV) carbenes for the metathesis of olefins. Direct observation and identification of the chain carrying carbene complexes in a highly active catalyst system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1982, (9), 514-516.
- [30] LEFEBVRE, F., M. LECONTE, S. PAGANO, A. MUTCH, et al. Aryloxy complexes and cyclometallated aryloxy alkylidene complexes of tungsten (VI). Application to the metathesis of functionalized olefins. *Polyhedron*, 1995, 14(22), 3209-3226.

- [31] QUIGNARD, F., M. LECONTE AND J.-M. BASSET. Synthesis and catalytic properties of $W(OAr)_2Cl_2(CHCMe_3)(OR_2)$ and $W(OAr)_2Cl(CHCMe_3)(CH_2CMe_3)(OR_2)$ (Ar = 2,6-disubstituted phenyl; R = Et or Pri), new uni-component catalysts for metathesis of acyclic and cyclic olefins, with or without functional groups. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1985, (24), 1816-1817.
- [32] SCHROCK, R., S. ROCKLAGE, J. WENGROVIUS, G. RUPPRECHT, et al. Preparation and characterization of active niobium, tantalum and tungsten metathesis catalysts. *Journal of Molecular Catalysis*, 1980, 8(1-3), 73-83.
- [33] TEBBE, F. N., G. W. PARSHALL AND G. S. REDDY. Olefin homologation with titanium methylene compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 1978, 100(11), 3611-3613.
- [34] JOLLY, P. W. AND R. PETTIT. Evidence for a Novel Metal-Carbene System. *Journal of the American Chemical Society*, 1966, 88(21), 5044-5045.
- [35] GUERCHAI, V. AND D. ASTRUC. New entry to pentamethylcyclopentadienyl iron chemistry and the methylene complexes $[(\eta^5-C_5Me_5)Fe(CO)(L)(CH_2)]^+ (L = CO \text{ or } PPh_3)$. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1985, (12), 835-837.
- [36] GREEN, M. L. H., L. C. MITCHARD AND M. G. SWANWICK. Carbene complexes of iron, molybdenum, and ruthenium: a new route to metal-carbene derivatives. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*, 1971, 794-797.
- [37] GRUBBS, R. AND W. TUMAS. Polymer synthesis and organotransition metal chemistry. *Science*, 1989, 243(4893), 907-915.
- [38] NOVAK, B. M. AND R. H. GRUBBS. Catalytic organometallic chemistry in water: the aqueous ring-opening metathesis polymerization of 7-oxanorbornene derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 1988, 110(22), 7542-7543.
- [39] DEMONCEAU, A., A. F. NOELS, E. SAIVE AND A. J. HUBERT. Ruthenium-catalysed ring-opening metathesis polymerization of cycloolefins initiated by diazoesters. *Journal of Molecular Catalysis*, 1992, 76(1-3), 123-132.
- [40] FRANCE, M. B., R. H. GRUBBS, D. V. MCGRATH AND R. A. PACIELLO. Chain transfer during the aqueous ring-opening metathesis polymerization of 7-oxanorbornene derivatives. *Macromolecules*, 1993, 26(18), 4742-4747.
- [41] NGUYEN, S. T., L. K. JOHNSON, R. H. GRUBBS AND J. W. ZILLER. Ring-opening metathesis polymerization (ROMP) of norbornene by a Group VIII carbene complex in protic media. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(10), 3974-3975.
- [42] SCHWAB, P., M. B. FRANCE, J. W. ZILLER AND R. H. GRUBBS. A Series of Well-Defined Metathesis Catalysts—Synthesis of $[RuCl_2(\eta^5-CHR')(PR_3)_2]$ and Its Reactions. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1995, 34(18), 2039-2041.
- [43] STUMPF, A. W., E. SAIVE, A. DEMONCEAU AND A. F. NOELS. Ruthenium-based catalysts for the ring opening metathesis polymerisation of low-strain cyclic olefins and of functionalised derivatives of norbornene and cyclooctene. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1995, (11), 1127-1128.
- [44] CHATTERJEE, A. K., T.-L. CHOI, D. P. SANDERS AND R. H. GRUBBS. A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(37), 11360-11370.

-
- [45] LOVE, J. A., M. S. SANFORD, M. W. DAY AND R. H. GRUBBS. Synthesis, Structure, and Activity of Enhanced Initiators for Olefin Metathesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(33), 10103-10109.
- [46] MORRILL, C. AND R. H. GRUBBS. Synthesis of Functionalized Vinyl Boronates via Ruthenium-Catalyzed Olefin Cross-Metathesis and Subsequent Conversion to Vinyl Halides. *The Journal of Organic Chemistry*, 2003, 68(15), 6031-6034.
- [47] SCHOLL, M., S. DING, C. W. LEE AND R. H. GRUBBS. Synthesis and Activity of a New Generation of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Coordinated with 1,3-Dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene Ligands. *Organic Letters*, 1999, 1(6), 953-956.
- [48] SCHOLL, M., T. M. TRNKA, J. P. MORGAN AND R. H. GRUBBS. Increased ring closing metathesis activity of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with imidazolin-2-ylidene ligands. *Tetrahedron Letters*, 1999, 40(12), 2247-2250.
- [49] TRNKA, T. M., J. P. MORGAN, M. S. SANFORD, T. E. WILHELM, et al. Synthesis and Activity of Ruthenium Alkylidene Complexes Coordinated with Phosphine and N-Heterocyclic Carbene Ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(9), 2546-2558.
- [50] ACKERMANN, L., A. FÜRSTNER, T. WESKAMP, F. J. KOHL, et al. Ruthenium carbene complexes with imidazolin-2-ylidene ligands allow the formation of tetrasubstituted cycloalkenes by RCM. *Tetrahedron Letters*, 1999, 40(26), 4787-4790.
- [51] HANSEN, S. M., M. A. O. VOLLAND, F. ROMINGER, F. EISENTRÄGER, et al. A New Class of Ruthenium Carbene Complexes: Synthesis and Structures of Highly Efficient Catalysts for Olefin Metathesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 1999, 38(9), 1273-1276.
- [52] MICHROWSKA, A., R. BUJOK, S. HARUTYUNYAN, V. SASHUK, et al. Nitro-Substituted Hoveyda-Grubbs Ruthenium Carbenes: Enhancement of Catalyst Activity through Electronic Activation. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(30), 9318-9325.
- [53] MIYAZAKI, H., M. B. HERBERT, P. LIU, X. DONG, et al. Z-Selective Ethenolysis with a Ruthenium Metathesis Catalyst: Experiment and Theory. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(15), 5848-5858.
- [54] MARTIN, M. AND G. GUIOCHON. Effects of high pressure in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1090(1-2), 16-38.
- [55] XIANG, Y., Y. LIU AND M. L. LEE. Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1104(1-2), 198-202.
- [56] ABIDI, S. L. High-performance liquid chromatography of phosphatidic acids and related polar lipids. *Journal of Chromatography A*, 1991, 587(2), 193-203.
- [57] BYRDWELL, W. C. W.C. Byrdwell (ed.). Qualitative and Quantitative Analysis of Triacylglycerols by Atmospheric Pressure Ionization (APCI and ESI) Mass Spectrometry Techniques. In *Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography*. AOCS Publishing, Champaign, IL, 2005, p. 298-412.
- [58] HOLČAPEK, M., P. JANDERA, P. ZDERADIČKA AND L. HRUBÁ. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1010(2), 195-215.

-
- [59] MEDVEDOVICI, A., K. LAZOU, A. D'OOSTERLINCK, Y. ZHAO, et al. Analysis of jojoba oil by LC-coordination ion spray-MS (LC-CIS-MS). *Journal of Separation Science*, 2002, 25(3), 173-178.
- [60] SEO, H. S., Y. ENDO, K. FUJIMOTO, M. MOKU, et al. Characterization of molecular species of wax esters in myctophid fishes. *Fisheries Science*, 1998, 64(3), 423-427.
- [61] SPENCER, G., R. PLATTNER AND T. MIWA. Jojoba oil analysis by high pressure liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1977, 54(5), 187-189.
- [62] TADA, A., Z.-L. JIN, N. SUGIMOTO, K. SATO, et al. Analysis of the Constituents in Jojoba Wax Used as a Food Additive by LC/MS/MS. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 2005, 46(5), 198-204.
- [63] MONETI, G., G. PIERACCINI, F. R. DANI, S. CATINELLA, et al. Acetonitrile as an Effective Reactant Species for Positive-ion Chemical Ionization of Hydrocarbons by Ion-trap Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996, 10(2), 167-170.
- [64] MONETI, G., G. PIERACCINI, F. DANI, S. TURILLAZZI, et al. Ion-molecule reactions of ionic species from acetonitrile with unsaturated hydrocarbons for the identification of the double-bond position using an ion trap. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, 32(12), 1371-1373.
- [65] GRAY, G. A. Study of ion-molecule reactions and reaction mechanisms in acetonitrile by ion cyclotron resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 1968, 90(22), 6002-6008.
- [66] HEERMA, W., M. M. SARNEEL AND G. DIJKSTRA Structure and formation of gaseous $[C_3H_4N]^+$ ions. *Organic Mass Spectrometry*, 1986, 21(10), 681-687.
- [67] MONETI, G., G. PIERACCINI, D. FAVRETTO AND P. TRALDI. Acetonitrile in chemical ionization of monounsaturated hydrocarbons: a ^{13}C and 2H labeling study. *Journal of Mass Spectrometry*, 1998, 33(11), 1148-1149.
- [68] WINCEL, H. Gas-phase equilibria studies of $C_2H_2N^+$ and $C_3H_4N^+$ with CH_3CN . *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1998, 175(3), 283-291.
- [69] WINCEL, H., S. WŁODEK AND D. K. BOHME. Acetonitrile in gas-phase ion/molecule chemistry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1988, 84(1-2), 69-87.
- [70] BUTOVICH, I. A., E. UCHIYAMA AND J. P. MCCULLEY Lipids of human meibum: mass-spectrometric analysis and structural elucidation. *J Lipid Res*, 2007, 48(10), 2220-2235.
- [71] BUTOVICH, I. A., J. C. WOJTOWICZ AND M. MOLAI Human tear film and meibum. Very long chain wax esters and (O-acyl)-omega-hydroxy fatty acids of meibum. *J Lipid Res*, 2009, 50(12), 2471-2485.
- [72] VRKOSLAV, V., M. HÁKOVÁ, K. PECKOVÁ, K. URBANOVÁ, et al. Localization of double bonds in wax esters by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry utilizing the fragmentation of acetonitrile-related adducts. *Anal Chem*, Apr 15 2011, 83(8), 2978-2986.
- [73] XU, Y. AND J. T. BRENNAN. Atmospheric Pressure Covalent Adduct Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry for Double Bond Localization in Monoene- and Diene-Containing Triacylglycerols. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(6), 2525-2536.

- [74] VRKOSLAV, V. AND J. CVAČKA. Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2012, 1259, 244-250.
- [75] Ruthenium - 1,3-Bis(2,4,6-trimethylphenyl)-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene[2-(i-propoxy)-5-(N,N-dimethylaminosulfonyl)phenyl]methylenruthenium(II) dichloride Zhan Catalyst-1B. In.: Strem [online]. Strem Chemicals. [vid. 23.04.2015]. Dostupné z: http://www.strem.com/catalog/v/44-0082/59/ruthenium_918870-76-5.
- [76] SHINDE, T., V. VARGA, M. POLÁŠEK, M. HORÁČEK, et al. Metathesis of cardanol over Ru catalysts supported on mesoporous molecular sieve SBA-15. *Applied Catalysis A: General*, 2014, 478, 138-145.
- [77] MMONGOYO, J. A., Q. A. MGANI, S. J. M. MDACHI, P. J. POGORZELEC, et al. Synthesis of a kairomone and other chemicals from cardanol, a renewable resource. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114(10), 1183-1192.
- [78] RINIA, H. A., K. N. J. BURGER, M. BONN AND M. MÜLLER. Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy on lipid droplets in HeLa cells. In *SPIE-OSA*. 2007, vol. 6630, p. 66300S-66301-66300S-66309.
- [79] SALPIN, J.-Y., M. T. NGUYEN, G. BOUCHOUX, P. GERBAUX, et al. Isomerization of Acetonitrile N-Methylide $[\text{CH}_3\text{CNCH}_2]^{*+}$ and N-Methylketenimine $[\text{CH}_3\text{NCCH}_2]^{*+}$ Radical Cations in the Gas Phase: Theoretical Study of the $[\text{C}_3\text{H}_5\text{N}]^{*+}$ Potential Energy Surface. *The Journal of Physical Chemistry A*, 1999, 103(7), 938-946.
- [80] GERBAUX, P., R. FLAMMANG, M. T. NGUYEN, J. Y. SALPIN, et al. Formation and Characterization of Acetonitrile N-Methylide $[\text{CH}_3\text{CNCH}_2]^{*+}$ and N-Methylketenimine $[\text{CH}_3\text{NCCH}_2]^{*+}$ Radical Cations in the Gas Phase. *The Journal of Physical Chemistry A*, 1998, 102(5), 861-869.
- [81] POLÁŠEK, M., Z. FLENEROVÁ, J. ŽABKA, J. CVAČKA. On the reaction mechanism behind the double-bond localization technique utilizing acetonitrile-APCI MS. In *14th European Symposium on Organic Reactivity (ESOR 2013)*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze a Ústav organické chemie a biochemie, 2013.